

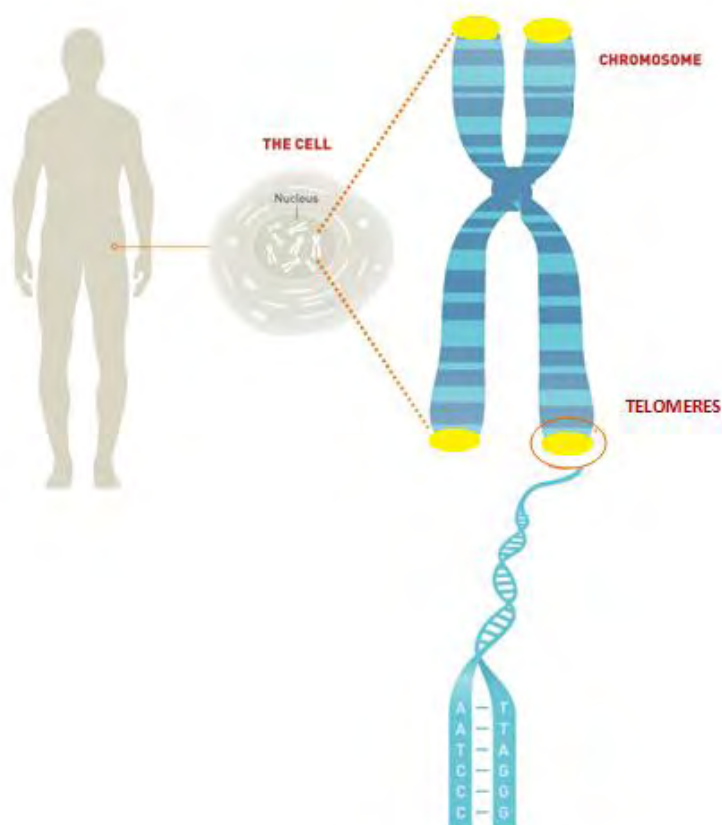


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Η μελέτη των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

TERT promoter mutations in thyroid cancer in the Greek population.



Φοιτήτρια: Αγγελοπούλου Ζαχαρούλα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λιαδάκη Καλλιόπη

Λάρισα, 2017

## Περίληψη

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας στον ανθρώπινο σώμα και εκκρίνει τις ορμόνες θυροξίνη, τριιωδοθυρονίνη και καλσιτονίνη, οι οποίες ρυθμίζουν πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά κατατάσσεται σε τέσσερις βασικούς τύπους (θηλώδης, θυλακιώδης, μυελοειδής, αναπλαστικός), ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Προηγούμενες μελέτες αποκάλυψαν ότι ορισμένες μεταλλάξεις, ιδιαίτερα αυτές που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης σχετίζονται με θυρεοειδικές νεοπλασίες. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με τη συχνότητα των μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μεταλλάξεων C250T, C228T και C243T C242T σε διάφορους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Συνολικά μελετήθηκαν 37 δείγματα από ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, που περιλαμβάνουν 18 θηλώδη, 14 θηλώδη καρκινώματα θυλακιώδους υποτύπου, 4 θυλακιώδη και 1 μυελοειδές καρκίνωμα. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδίου TERT, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και την απευθείας αλληλούχηση των καθαρισμένων προϊόντων. Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκε μόνο ένα δείγμα που φέρει την μετάλλαξη C228T, ενώ οι μεταλλάξεις C250T και C243T C242T δεν βρέθηκαν σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μετάλλαξη C228T ανιχνεύθηκε σε θηλώδες καρκίνωμα μίας ασθενούς και συνυπάρχει με την μετάλλαξη του γονιδίου BRAF. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

## **Abstract**

The thyroid gland is the biggest endocrine gland in the human body which produces the iodine-containing thyroid hormones triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and the peptide hormone calcitonin, which have a wide range of effects on the human body. Thyroid carcinomas are the most common malignancies and their frequency is steadily increasing. According to their cellular origin, degree of differentiation and histopathological features, thyroid carcinomas are grouped into papillary, follicular, poorly differentiated, anaplastic and myeloid carcinomas. Additional variants exist between these major types, with the most common being the follicular subtype of papillary carcinoma. Previous studies have shown that certain mutations, especially the ones which result in the activation of the MAP kinase signaling pathway, play an important role in the pathogenesis of thyroid cancer. Recent studies have also shown that genetic alterations in the promoter of the TERT gene were associated with the thyroid malignancy. This study examined for the first time the presence of TERT promoter mutations, specifically C250T, C228T and C243T C242T, in different types of thyroid carcinomas in the Greek population. The study involved 37 patients with differentiated thyroid cancer including 18 with papillary, 14 with the follicular variant of papillary carcinoma, 4 with follicular and one with myeloid carcinoma. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from formalin fixed paraffin embedded tissues, specific amplification of the region of interest using polymerase chain reaction (PCR) followed by sequencing of the PCR products. We identified one sample carrying the C228T mutation, but no C250T and C243T C242T mutations were found in all the examined samples. The patient that carried the C228T mutation belongs to a woman with papillary carcinoma of follicular variant, which also carried the BRAF V600E mutation. In order to be able to draw firm conclusions about the frequency of TERT promoter mutations in thyroid cancer, the present study must be extended in a larger sample population.

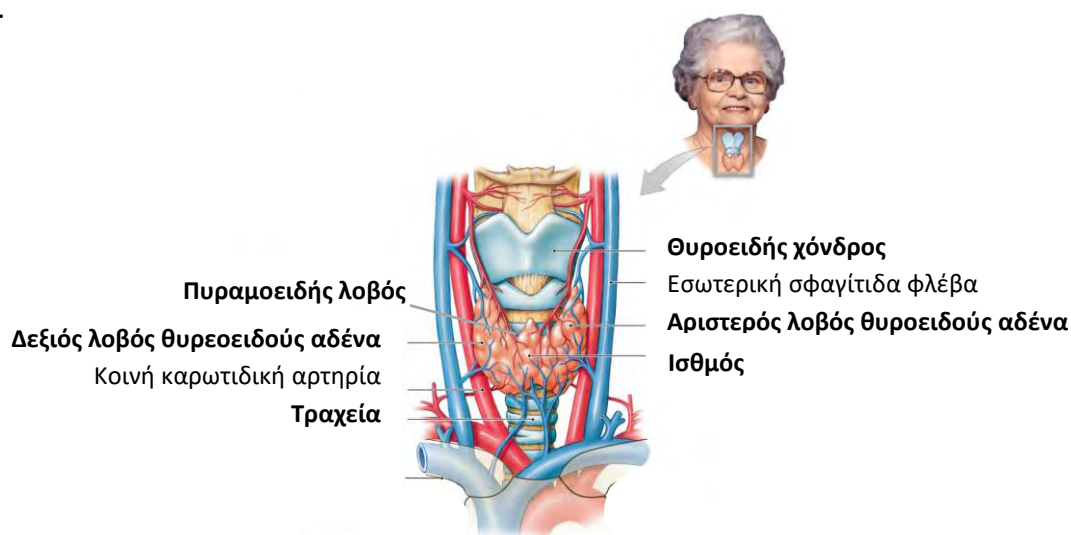
## **Περιεχόμενα:**

1. Θυρεοειδής αδένας και νόσοι του θυρεοειδούς.....	5
1.1 Εισαγωγή στον θυρεοειδή αδέναν.....	5
1.1.2 Εμβρυολογική προέλευση του θυρεοειδούς αδέναν.....	6
1.1.3 Ιστολογία του θυρεοειδούς αδέναν.....	6
1.2 Θυρεοειδικές ορμόνες.....	7
1.2.1 Φυσιολογική λειτουργία των θυρεοειδικών ορμονών.....	8
1.3 Νόσοι του θυρεοειδούς αδέναν.....	10
1.3.1 Υπερθυρεοειδισμός.....	10
1.3.2 Υποθυρεοειδισμός.....	10
1.3.3 Θυρεοειδικοί όγκοι.....	11
1.4 Γενετικές αλλαγές στους διάφορους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς αδέναν.....	12
1.5 Τελομερή και τελομεράση.....	17
1.5.1 Τελομερή.....	17
1.5.2 Τελομεράση.....	18
1.5.3 Τελομεράση και ο βιολογικός ρόλος στην ογκογένεση.....	19
1.5.4 Το γονίδιο TERT.....	19
1.5.4.1 Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδέναν.....	21
1.5.4.2 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης με τις μεταλλάξεις RAS στον θυρεοειδικό καρκίνο.....	22
1.5.4.3 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης με τις μεταλλάξεις BRAF στον θυρεοειδικό καρκίνο.....	22
1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση των θυρεοειδικών καρκίνων.....	24
2. Στόχος.....	26
3. Δείγματα ασθενών και μέθοδοι.....	27
3.1 Δείγματα ασθενών.....	27
3.2 Μέθοδοι.....	27
3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPE τομές ιστών.....	27
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	29
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
3.2.4 Καθαρισμός προϊόντων της PCR.....	34
3.2.5 Αλληλούχηση καθαρισμένων δειγμάτων PCR.....	35
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	36
4.1 Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου TERT με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	36
4.2 Αλληλούχηση δειγμάτων.....	37
5. Βιβλιογραφία .....	40

## 1.Θυροειδής αδένας και νόσοι του θυρεοειδούς.

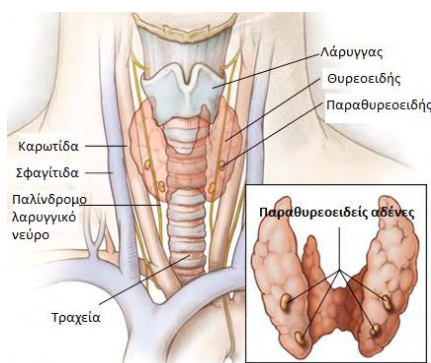
### 1.1 Εισαγωγή στον θυρεοειδή αδέν

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρώπινου σώματος. Εντοπίζεται αμέσως κάτω από τον λάρυγγα, εκατέρωθεν και μπροστά από την τραχεία. Το βάρος του κατά τη γέννηση είναι 2 γραμμάρια, ενώ στον ενήλικα κυμαίνεται από 15-20 γραμμάρια και εξαρτάται από τη λειτουργικότητά του, το φύλο, πολλούς ορμονικούς παράγοντες και το βάρος του σώματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από 2 λοβούς, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους στη μέση γραμμή, τον ισθμό (Gray and Carter, 2016). Κάθε λοβός έχει διαστάσεις 5x3x1,5 εκατοστά και αποτελείται από ένα άθροισμα μικρότερων μονάδων που λέγονται λοβία. Επίσης, σε ορισμένους ανθρώπους, υπάρχει και ένας τρίτος λοβός, ο πυραμοειδής, που είναι μια προσεκβολή του θυρεοειδούς προς τα άνω.



**Εικόνα 1:** Η θέση του θυρεοειδούς αδέν.

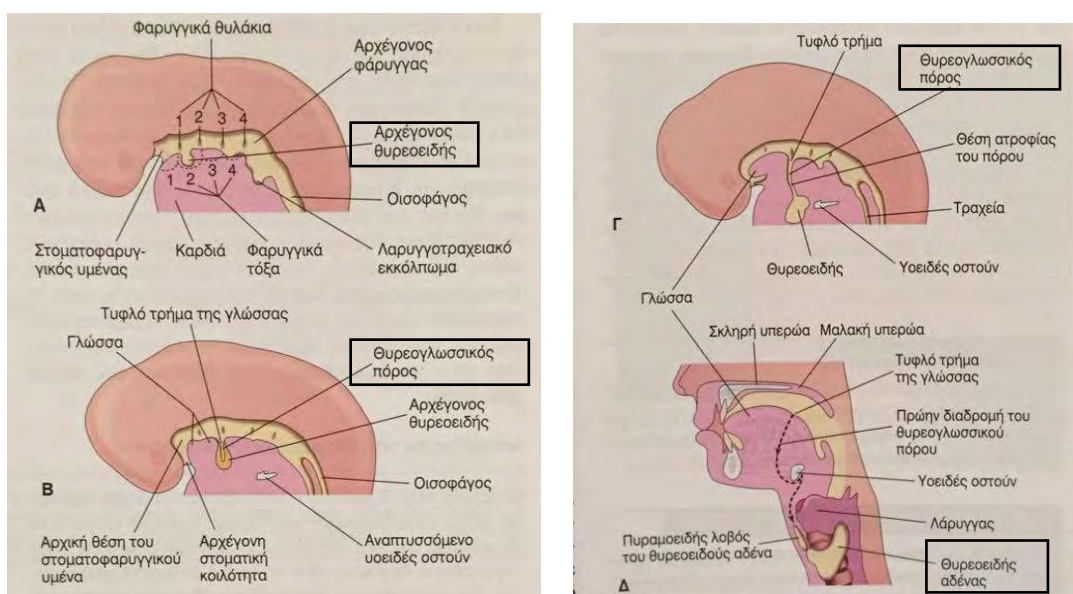
Οι παραθυρεοειδείς αδένες, είναι στους περισσότερους ανθρώπους τέσσερις. Βρίσκονται συνήθως στην οπισθοπλάγια επιφάνεια, ενίοτε όμως υπό την κάψα ή εντός βαθέων αυλάκων και σχισμών του θυρεοειδούς όπου αποκρύπτονται τελείως (Εικόνα 2) .



**Εικόνα 2 :** Απεικόνιση των παραθυρεοειδών αδένων

### 1.1.2 Εμβρυολογική προέλευση του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο πρώτος ενδοκρινής αδένας που αναπτύσσεται στο έμβρυο, περίπου 17 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, σχηματιζόμενος από μία πάχυνση του ενδοδέρματος στο μέσον του εδάφους του αρχέγονου φάρυγγα (Εικόνα 3Α). Αυτή η πάχυνση σύντομα σχηματίζει ένα μικρό εκκόλπωμα – τον αρχέγονο θυρεοειδή. Καθώς το έμβρυο και η γλώσσα αυξάνονται, ο αναπτυσσόμενος θυρεοειδής μετατοπίζεται προς τα κάτω, και για ένα μικρό διάστημα, ο θυρεοειδής στην προς τα κάτω πορεία του συνδέεται με τη γλώσσα με ένα στενό πόρο, τον θυρεογλωσσικό πόρο (Εικόνα 3Β, 3Γ). Αρχικά ο αρχέγονος θυρεοειδής γίνεται μία συμπαγής κυτταρική μάζα και χωρίζεται σε αριστερό και δεξιό λοβό που συνδέονται μεταξύ τους με τον ισθμό. Στο έμβρυο των 7 εβδομάδων ο θυρεοειδής αδένας παίρνει το οριστικό του σχήμα και συνήθως βρίσκεται στην τελική του θέση (Εικόνα 3Δ). Ταυτόχρονα ο θυρεογλωσσικός πόρος φυσιολογικά εκφυλίζεται και τελικά εξαφανίζεται. Σ' ένα ποσοστό 50% περίπου των ανθρώπων υπάρχει ένας πυραμοειδής λοβός του θυρεοειδούς αδένος που επεκτείνεται από τον ισθμό προς τα άνω (Moore et al. 2009).

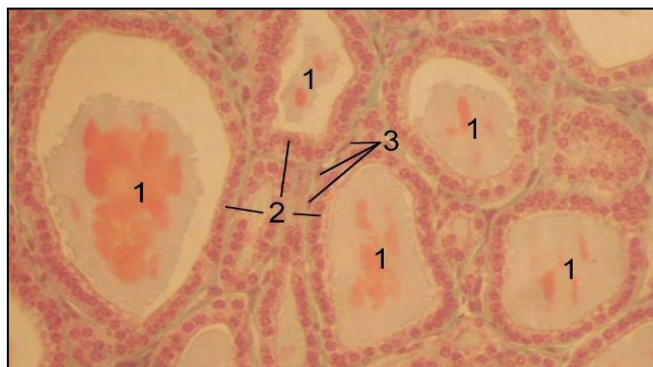


**Εικόνα 3 :** Οι διατομές της κεφαλής και του τραχήλου, εμβρύου ηλικίας 4 (Α), 5 (Β) και 6 (Γ) εβδομάδων και ενηλίκου (Δ).

### 1.1.3 Ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ένας κοίλος αδένας και αποτελείται από τα θυρεοειδικά κυστίδια (θυλάκια), τα οποία είναι ωοειδείς κοιλότητες και περιέχουν μια άμορφη ουσία που ονομάζεται κολλοειδές (Εικόνα 4). Αυτό αποτελείται κυρίως από θυρεοσφαιρίνη και μικρές ποσότητες ιωδιούχας θυρεοαλβουμίνης. Η θυρεοσφαιρίνη αποτελεί την πρόδρομη ουσία των θυρεοειδικών ορμονών και γι' αυτό

χαρακτηρίζεται ως προ-ορμόνη. Μεταξύ των γειτονικών θυλακίων υπάρχει συνδετικός ιστός πλούσιος σε αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Επίσης γύρω από τα θυλάκια υπάρχουν άφθονα θυλακιώδη κύτταρα, από τα οποία όπως θα αναφερθεί παρακάτω προέρχονται οι συχνότεροι τύποι θυρεοειδικού καρκίνου. Τα παραθυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος ή κύτταρα C εκκρίνουν την ορμόνη καλσιτονίνη, η οποία συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων του ασβεστίου και του φωσφόρου στο αίμα.



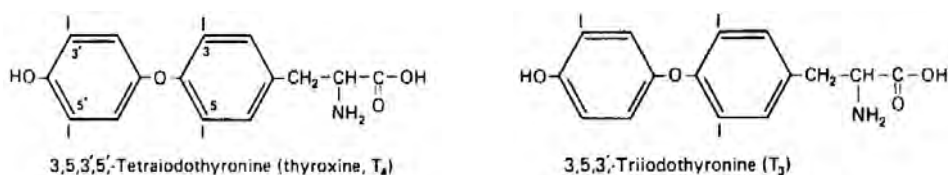
**Εικόνα 4:** Η ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος. 1. Τα θυρεοειδικά θυλάκια, 2. Τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς, 3. Τα παραθυλακιώδη κύτταρα (κύτταρα C) του θυρεοειδούς (Fawcett & Jensh, 2002).

### 1.2 Θυρεοειδικές ορμόνες

Ο θυρεοειδής αδένος εκκρίνει δύο σημαντικές ορμόνες, τη θυροξίνη (T4) και την τριιωδιοθυρονίνη (T3), οι χημικοί τύποι των οποίων φαίνονται στην Εικόνα 5. Και οι δύο ασκούν ισχυρή επίδραση στην αύξηση του μεταβολικού ρυθμού του σώματος, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά στην ταχύτητα και την ένταση της δράσης τους. Η T3 εμφανίζει περίπου τετραπλάσια δραστηριότητα σε σύγκριση με την T4, βρίσκεται όμως στο αίμα σε μικρότερη ποσότητα (7%) και παραμένει εκεί για βραχύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με την T4 (93%). Η παντελής έλλειψη της έκκρισης από τον θυρεοειδή αδένος συνεπάγεται συνήθως ελάττωση του βασικού μεταβολικού ρυθμού κατά 40 έως 50% περίπου κάτω από το φυσιολογικό επίπεδο, ενώ κατά τη μέγιστη υπέρμετρη αύξηση της έκκρισης ο βασικός μεταβολισμός του ατόμου μπορεί να αυξάνεται κατά 60 έως 100% πάνω από το φυσιολογικό επίπεδο. Η έκκριση των ορμονών αυτών από τον θυρεοειδή αδένος ελέγχεται κυρίως από τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH) που εκκρίνεται από το πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Επίσης από τα κύτταρα C εκκρίνεται η καλσιτονίνη, που ρυθμίζει το μεταβολισμό του ασβεστίου. Συγκεκριμένα, όταν υπάρχουν στο αίμα υψηλά επίπεδα ασβεστίου (υπερασβεστιαιμία) εκκρίνεται καλσιτονίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απορρόφησης του ασβεστίου από το γαστρεντερικό σωλήνα, την αναστολή της απορρόφησης του ασβεστίου από τα οστά (από τους οστεοκλάστες και τα



οστεοκύτταρα) και την αύξηση της απέκκρισης του ασβεστίου από τα νεφρά. Οι δράσεις αυτές είναι ανταγωνιστικές προς την παραθορμόνη και οδηγούν σε μείωση των επιπέδων του ασβεστίου στο αίμα.



**Εικόνα 5:** Η χημική δομή των θυρεοειδικών ορμονών T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub>.

### 1.2.1 Η φυσιολογική λειτουργία των θυρεοειδικών ορμονών

Οι επιδράσεις των θυρεοειδικών ορμονών στον οργανισμό συνοψίζονται στην εικόνα 6 (Guyton and Hall, 2013).

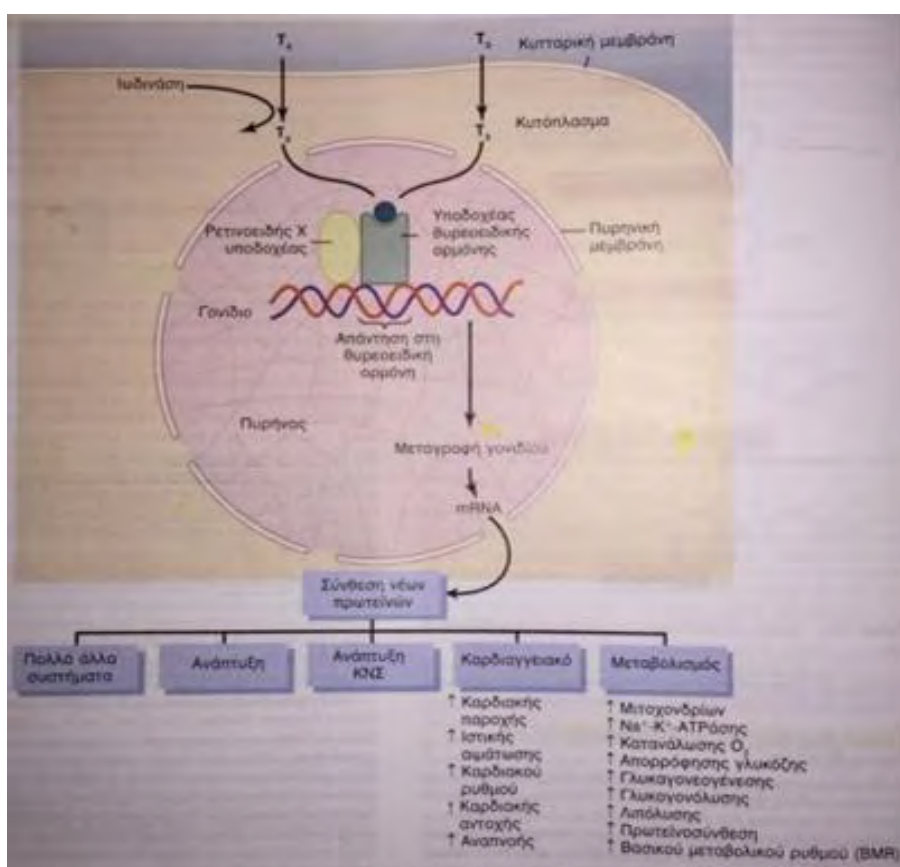
- 1) Οι θυρεοειδικές ορμόνες ενισχύουν την κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα. Ο ρυθμός χρησιμοποίησης των θρεπτικών ουσιών για τη παροχή ενέργειας επιταχύνεται κατά πολύ. Επίσης, ο ρυθμός της αύξησης του σώματος σε νεαρά άτομα επιταχύνεται σε μεγάλο βαθμό και τέλος οι διανοητικές διεργασίες διεγείρονται, και η δραστηριότητα των περισσότερων ενδοκρινών αδένων αυξάνεται.
- 2) Οι θυρεοειδικές ορμόνες επιδρούν στην αύξηση του σώματος. Ειδικότερα στον άνθρωπο, η επίδραση των ορμονών αυτών εκδηλώνεται κυρίως στα αναπτυσσόμενα παιδιά. Οι ορμόνες προάγουν την αύξηση και την ανάπτυξη του εγκεφάλου κατά την εμβρυϊκή ζωή καθώς και κατά τα πρώτα χρόνια της μετεμβρυϊκής ζωής. Εάν στο έμβρυο δεν εκκρίνεται επαρκής ποσότητα θυροξίνης, τότε η αύξηση και η ωρίμανση του εγκεφάλου, επιβραδύνονται σε μεγάλο βαθμό και ο εγκέφαλος παραμένει σε μικρότερο μέγεθος από το φυσιολογικό.
- 3) Οι θυρεοειδικές ορμόνες επιδρούν σε ειδικούς μηχανισμούς του σώματος, όπως:
  - Διέγερση του μεταβολισμού των υδατανθράκων: Οι ορμόνες του θυρεοειδούς αδένος διεγείρουν σχεδόν όλες τις διεργασίες του μεταβολισμού των υδατανθράκων, συμπεριλαμβάνοντας την ταχεία πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, την ενίσχυση της γλυκόλυσης, την ενίσχυση της νεογλυκογένεσης, την αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης, με τις συνακόλουθες δευτερογενείς επιδράσεις στον μεταβολισμό των υδατανθράκων.
  - Διέγερση του μεταβολισμού των λιπών: Τα λιπίδια κινητοποιούνται ταχύτατα από τον λιπώδη ιστό και έτσι ελαττώνονται τα αποθέματα του λίπους στο σώμα σε μεγάλο βαθμό. Επίσης, αυξάνεται η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο



πλάσμα. Οι θυρεοειδικές ορμόνες επιταχύνουν επίσης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων στα κύτταρα.

- Αύξηση του μεταβολισμού των βιταμινών: Επειδή οι βιταμίνες αποτελούν ουσιώδη τμήματα ορισμένων ενζύμων και συνενζύμων, οι θυρεοειδικές ορμόνες αυξάνουν τις ανάγκες του σώματος για βιταμίνες. Γι' αυτό μπορεί να παρατηρείται σχετική ανεπάρκεια σε περιπτώσεις υπερέκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών, εάν παράλληλα δεν καθίστανται διαθέσιμες για τον οργανισμό αυξημένες ποσότητες βιταμινών.

4) Οι θυρεοειδικές ορμόνες τέλος επιδρούν στο καρδιαγγειακό σύστημα, αυξάνοντας την αιμάτωση, την καρδιακή παροχή και την καρδιακή συχνότητα.



**Εικόνα 6:** Σύνοψη των λειτουργιών των θυρεοειδικών ορμονών στον οργανισμό.

### **1.3 Νόσοι του θυρεοειδούς**

#### **1.3.1.Υπερθυρεοειδισμός**

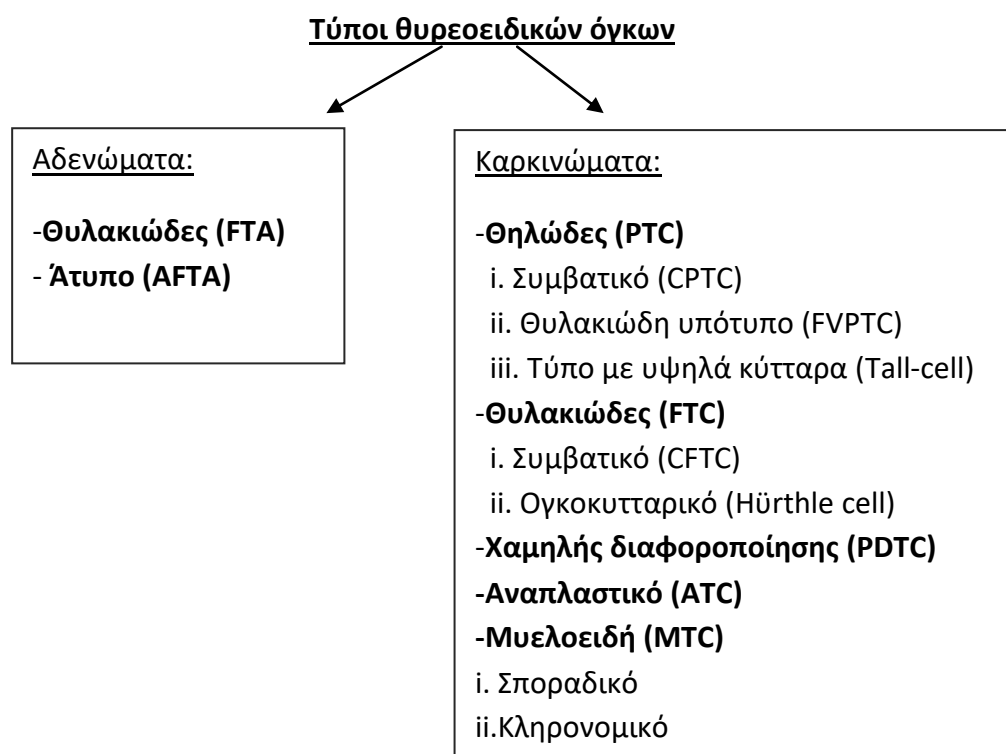
Στους περισσότερους ασθενείς με υπερθυρεοειδισμό, ολόκληρος ο θυρεοειδής αδένας αυξάνεται σε μέγεθος κατά 2 με 3 φορές πέρα από το φυσιολογικό. Επίσης ο ρυθμός έκκρισης από κάθε κύτταρο αυξάνεται στο πολλαπλάσιο του φυσιολογικού. Η ασθένεια του Graves είναι η πιο κοινή μορφή υπερθυρεοειδισμού. Πρόκειται για μία αυτοάνοση ασθένεια κατά την οποία σχηματίζονται αντισώματα που ονομάζονται θυρεοτρόπες ανοσοσφαιρίνες για τον υποδοχέα της TSH, με αποτέλεσμα την πρόκληση υπερθυρεοειδισμού. Τα συμπτώματα του υπερθυρεοειδισμού είναι προφανή από την προηγηθείσα εξέταση της φυσιολογίας των θυρεοειδικών ορμονών, από τη κατάσταση μεγάλης διεγερσιμότητας, αυξημένη εφίδρωση, απώλεια σωματικού βάρους, μυϊκή αδυναμία, νευρική ένταση, έντονος κάματος με αϋπνία και τρόμος στα χέρια. Τέλος σε κάποια άτομα προκαλείται κάποιος βαθμός προβολής του οφθαλμικού βολβού, γνωστός ως εξώφθαλμος.

#### **1.3.2.Υποθυρεοειδισμός**

Ο υποθυρεοειδισμός όπως και ο υπερθυρεοειδισμός πιθανώς, οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις σε αυτοανοσία έναντι του θυρεοειδούς αδένου (θυρεοειδίτιδα Hashimoto), αλλά αυτή η ανοσία καταστρέφει παρά διεγείρει τον αδένου (Guyton and Hall, 2013). Ο θυρεοειδής αδένας στους ασθενείς αυτούς εμφανίζει συνήθως στην αρχή θυρεοειδίτιδα, δηλαδή φλεγμονή του αδένου. Αυτή προκαλεί προοδευτική εκφύλιση και τελικά ίσως ίνωση του αδένου, με επακόλουθη μείωση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών. Επιπροσθέτως, διακρίνονται άλλοι τύποι υποθυρεοειδισμού, που σχετίζονται με τη μεγέθυνση του αδένου, και καλούνται ως θυρεοειδική βρογχοκήλη. Τα κυριότερα αίτια του υποθυρεοειδισμού είναι η θυρεοειδίτιδα, η ενδημική κολλοειδής βρογχοκήλη, η ιδιοπαθής κολλοειδής βρογχοκήλη, η καταστροφή του θυρεοειδούς αδένου από ακτινοβολία και η εγχειρητική εξαίρεση. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν συνήθως κάματο, έντονη υπνηλία, εξαιρετικά μεγάλη χαλαρότητα των μυών, βραδυκαρδία, ελαττωμένη καρδιακή παροχή, ελαττωμένο ποσό αίματος, σε μερικές περιπτώσεις παχυσαρκία, βραδύτητα διανοητικής λειτουργίας, ανεπάρκεια πολλών τροφικών λειτουργιών του σώματος όπως για παράδειγμα ελαττωμένη τριχοφυΐα και σε βαριές καταστάσεις ανάπτυξη οίδηματώδους εμφάνισης σε ολόκληρο το σώμα που ονομάζεται μυξοίδημα. Τα άτομα με βαρύ υποθυρεοειδισμό κατά την εμβρυϊκή, βρεφική και παιδική ηλικία εμφανίζουν κρετινισμό. Η ανάπτυξη του σκελετού στον κρετίνο είναι καθυστερημένη σε σύγκριση με την αύξηση των μαλακών ιστών. Συνέπεια της άνισης αυτής ανάπτυξης είναι ότι οι μαλακοί ιστοί ενδέχεται να μεγεθύνονται υπέρμετρα, με αποτέλεσμα ο κρετίνο να έχει εμφάνιση παχύσαρκου, κοντόχονδρου παιδιού.

### 1.3.3 Θυρεοειδικοί όγκοι

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος είναι η πιο κοινή κακοήθεια με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης. Οι θυρεοειδικοί όγκοι αποτελούν περίπου το 1% των συνολικών νεοπλασιών και το 80% των συνολικών ενδοκρινών κακοηθών νεοπλασιών. Οι θυρεοειδικοί όγκοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αδενώματα και καρκινώματα (Διάγραμμα 1). Το θυλακίωμα θυρεοειδικό αδένωμα είναι ο μοναδικός καλοήθης όγκος. Τα καρκινώματα ειδικότερα μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση την κυτταρική τους προέλευση, τον βαθμό διαφοροποίησής τους και τα ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά στις ακόλουθες κατηγορίες.



**Διάγραμμα 1:** Ταξινόμηση των τύπων θυρεοειδικού καρκίνου.

**Θηλώδες καρκίνωμα – Papillary thyroid cancer (PTC):** Το θηλώδες καρκίνωμα είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος (ποσοστό ~80%) (Fletcher, 2013). Η ανάπτυξή του επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως έκθεση σε ακτινοβολία ή σε ραδιενεργή σκόνη (ατύχημα Chernobyl). Γενικά τα PTCs είναι διαφοροποιημένα καρκινώματα του θυρεοειδούς αδένος και προέρχονται από θυλακίωμα κύτταρα (Xing, 2013). Τα καρκινώματα αυτά εμφανίζονται ως σταθερά οζίδια και διακρίνονται κυρίως σε συμβατικό (conventional, CPTC), σε θυλακίωμα υπότυπο (follicular variant, FVPTC), και σε τύπο με υψηλά κύτταρα (Tall cell).

**Θυλακίωμα καρκίνωμα – Follicular thyroid cancer (FTC):** Τα θυλακίωμα καρκινώματα εμφανίζονται με συχνότητα περίπου 15% (Fletcher, 2013). Είναι και αυτοί διαφοροποιημένοι όγκοι (DeLellis, 2004). Προέρχονται από θυλακίωμα κύτταρα

και κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η εισβολή στα αιμοφόρα αγγεία. Κατηγοριοποιείται σε συμβατικό (conventional follicular, CFTC) και σε ογκοκυτταρικό τύπο (thyroid Hürthle cell cancer).

**Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα- Poorly differentiated thyroid cancer (PDTC):**

Αυτός ο τύπος καρκινώματος προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα και η μορφολογία του τον κατατάσσει σε μία ενδιάμεση κατηγορία μεταξύ των διαφοροποιημένων καρκινωμάτων και των αναπλαστικών (μη διαφοροποιημένων) καρκινωμάτων (DeLellis, 2004). Τα PDTCs είναι μεγάλοι όγκοι, η συχνότητα εμφάνισής τους αγγίζει το 15% και έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να διηθηθούν σε περιβάλλοντες ιστούς και αγγεία (Walczyk et al., 2010).

**Αναπλαστικό καρκίνωμα – Anaplastic thyroid cancer (ATC):** Το ATC είναι μία εξαιρετικά σπάνια κακοήθης μορφή όγκου, χαρακτηρίζεται από μη διαφοροποιημένα κύτταρα και εμφανίζεται με συχνότητα περίπου 5-10% (Scopa, 2004). Είναι μεγάλοι όγκοι και συχνά διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς και διαταράσσουν τη φυσιολογική δομή του θυρεοειδούς αδένος (DeLellis, 2004). Ιστοπαθολογικά, παρουσιάζουν κυλινδρικά κύτταρα και γιγαντιαία κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες. Οι περισσότεροι ασθενείς με ATC συνήθως πεθαίνουν 6 μήνες μετά την διάγνωση.

**Μυελοειδή καρκίνωμα – Medullary thyroid cancer (MTC):** Το MTC προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα που παράγουν καλσιτονίνη (Pacini et al, 2010). Είναι διαφοροποιημένα καρκινώματα και αποτελούν το 5-8% των ανθρώπινων θυρεοειδικών καρκίνων. Τα κύτταρα C εντοπίζονται στο βασικό στρώμα των θύμων του θυρεοειδούς και αντιπροσωπεύουν το 1% όλων των θυρεοειδών κυττάρων. Ως εκ τούτου, το MTC αναφέρεται ως νευροενδοκρινικός όγκος. Περίπου το 75% των περιπτώσεων είναι σποραδικές και το υπόλοιπο 25% είναι μέρη του αυτοσωμικού κυρίαρχου συνδρόμου πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας τύπου 2 (MEN 2). Το MTC τείνει να μετασταθεί σε λεμφαδένες, ειδικά στους τραχηλικούς λεμφαδένες σε πρώιμο στάδιο. Οι μακρινές μεταστάσεις εντοπίζονται συχνά στο ήπαρ, στα οστά και στους πνεύμονες.

**1.4 Γενετικές αλλαγές στον καρκίνο του θυρεοειδούς.**

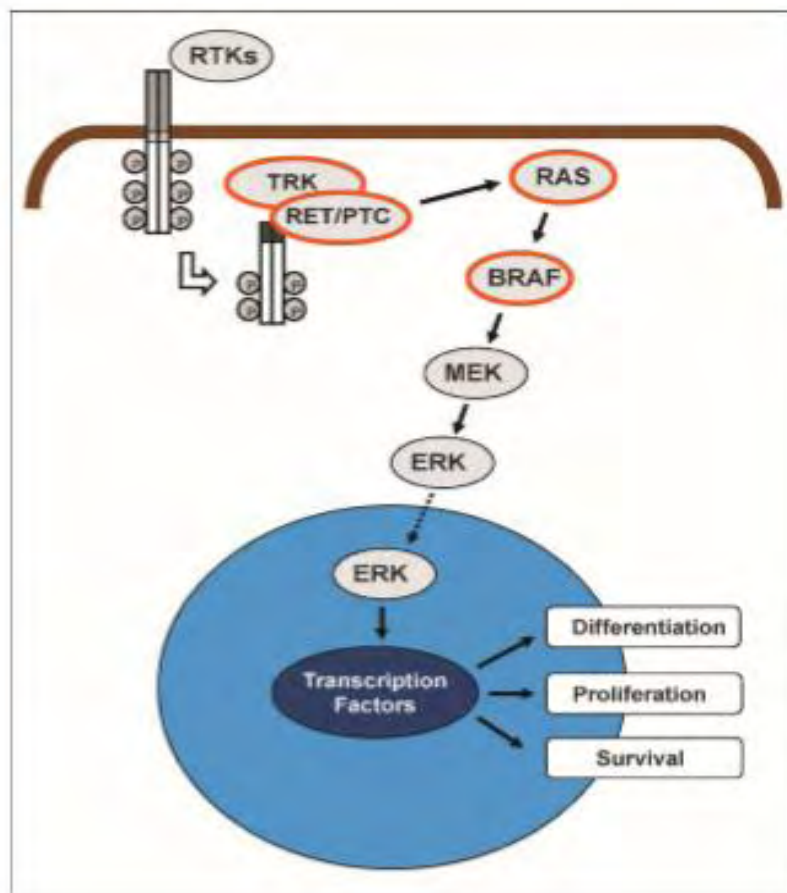
Έχουν παρατηρηθεί διάφορες γενετικές αλλαγές στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος και συνοψίζονται στον Πίνακα 1 (Nikiforova et al., 2009).

**Πίνακας 1:** Η απεικόνιση των ποσοστών επικράτησης των διαφόρων μεταλλάξεων στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς.

Τύποι όγκων	Συχνότητα εμφάνισης (%)
<b>Θηλώδες καρκίνωμα</b> BRAF RET/PTC RAS TRK	40-45 10-20 10-20 < 5
<b>Θυλακιώδες καρκίνωμα</b> RAS PAX8-PPAR $\gamma$ PIK3CA PTEN	40-50 30-35 < 10 < 10
<b>Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα</b> RAS $\beta$ -κατενίνη (CTNNB1) TP53 BRAF	25-30 10-20 20-30 10-15
<b>Αναπλαστικό καρκίνωμα</b> TP53 $\beta$ -κατενίνη (CTNNB1) RAS BRAF	70-80 60-70 40-50 20-30
<b>Μυελοειδές καρκίνωμα</b> Οικογενειακή μορφή RET Σποραδικό RET	> 95 40-50

- **Μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF**

Η πρωτεΐνη BRAF είναι μία κινάση σερίνης - θρεονίνης η οποία ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών, που αποτελούν ενδοκυτταρικούς τελεστές στο σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνο παράγοντα (Mitogen Activator Protein Kinase, MAPK). Η πρωτεΐνη BRAF μέσω των πρωτεϊνών RAS και μέσω στρατολόγησης άλλων πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγεί στη φωσφορυλίωση και τελικά στην ενεργοποίηση καθοδικών στόχων κατά μήκος του καταρράκτη των MAPK.



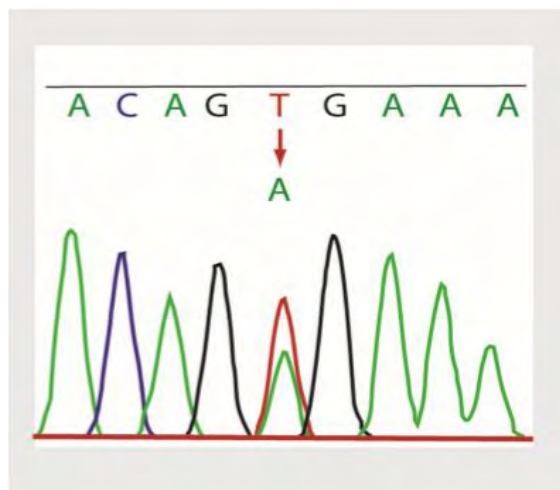
**Εικόνα 7:** Το μονοπάτι MAPK εξυπηρετεί στη διάδοση σημάτων από τους μεμβρανικούς υποδοχείς-κινάσες τυροσίνης (RTKs) στον πυρήνα μέσω μιας σειράς πρωτεϊνών προσαρμογής και ενδοκυτταρικών κινασών περιλαμβάνοντας τις RAS, RAF (κυρίως BRAF στα θυλακιώδη θυρεοειδικά κύτταρα), MEK και ERK. Η ενεργοποιημένη ERK μεταφέρεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF είναι οι πιο κοινές γενετικές αλλαγές που εντοπίζονται στο θηλώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα (40-45%) (Kimura et al., 2003). Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι σημειακές και πραγματοποιούνται κυρίως στο νουκλεοτίδιο 1799 το οποίο οδηγεί στη μετατροπή του κωδικονίου από βαλίνη σε γλουταμινικό στο κατάλοιπο 600 (V600E) (Hou et al., 2007). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης BRAF και τελικά σε χρόνια διέγερση του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK. Το 1-2% των θηλωδών καρκινωμάτων προέρχονται από άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF, όπως τη σημειακή μετάλλαξη K610E ή την ανακατάταξη AKAP9/BRAF. Εκτός από το PTC, η σημειακή μετάλλαξη BRAF V600E έχει εμφανιστεί στο PDTC και στο ATC, ενώ δεν έχει βρεθεί τόσο στο FTC όσο και σε καλοήγη θυρεοειδικά οζίδια. Γι' αυτό η μετάλλαξη αυτή αποτελεί έναν ειδικό προγνωστικό δείκτη για την ανίχνευση θηλωδών καρκινωμάτων και άλλων σχετικών όγκων (Chiose et al., 2009).

Έχειδειχθείότιομοριακόςέλεγχοςτηςμετάλλαξης BRAF V600E σε δείγματα που προέρχονται από παρακέντηση του θυρεοειδούς με βελόνα (Fine needle aspiration-FNA) βελτιώνει την ακρίβεια της κυτταρολογικής διάγνωσης των θυρεοειδικών οζιδίων. Συγκεκριμένα, η μελέτη 2.766 θυρεοειδικών δειγμάτων FNA έδειξε ότι από τα 580 από τα 581 δείγματα που είχαν την μετάλλαξη BRAF ήταν θηλώδη καρκινώματα (Nikiforova et al., 2009).

Επίσης, αυτή η σημειακή μετάλλαξη σχετίζεται με πιο επιθετικούς όγκους, οι οποίοι φέρουν χαρακτηριστικά όπως εξωθυρεοειδική επέκταση, λεμφαδένες και μεταστάσεις σε απομακρυσμένα σημεία. Η επιθετική συμπεριφορά αυτών των όγκων μπορεί να οφείλεται στην τάση τους να αποδιαφοροποιούνται και στο γεγονός ότι αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στη μεταβολή της λειτουργίας του συµμεταφορέα ιωδίου-νατρίου, μειώνοντας έτσι την ικανότητα των όγκων να παγιδεύουν ιώδιο και προδιαθέτοντας έτσι την αποτυχία της θεραπείας της υποτροπιάζουσας νόσου.

Τέλος η ανίχνευση των μεταλλάξεων BRAF σε δείγματα FNA (Jin et al, 2006) μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους όπως παραλλαγές της Real time PCR (probe specific, allele specific PCR) και απευθείας αλληλούχηση (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Η ανίχνευση της μετάλλαξης BRAF V600E μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιόπιστα με διάφορες τεχνικές όπως απευθείας αλληλούχηση.

- **Ανακατατάξεις RET/PTC**

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET κωδικοποιεί ένα μεμβρανικό υποδοχέα με ενεργότητα κίνησης τυροσίνης. Το RET εκφράζεται κυρίως στα θυρεοειδικά παραθυλακιώδη κύτταρα ή κύτταρα C και όχι στα θυλακιώδη κύτταρα και μπορεί να ενεργοποιηθεί από χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, γνωστές ως ανακατατάξεις RET/PTC. Έχουν ανιχνευτεί περίπου 11 διαφορετικές ανακατατάξεις, και η κάθε μία αφορά τη σύντηξη του RET με διαφορετικά γονίδια (Bongarzone et al., 1998). Οι 2 πιο κοινές ανακατατάξεις είναι οι RET/PTC1 και RET/PTC3. Η RET/PTC1 αφορά τη σύντηξη με το γονίδιο CCD6 (H4) και η RET/PTC3 με το γονίδιο NCOA (ELE1). Όλες οι συντήξεις



περιέχουν ακέραιη την περιοχή κινάσης τυροσίνης του RET υποδοχέα, η οποία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RET/PTC για να ενεργοποιήσει με τη σειρά της το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Η RET/PTC1 είναι ο πιο συχνός τύπος ανακατάταξης (60-70%), ενώ η RET/PTC3 εμφανίζεται περίπου σε συχνότητα 20-30%. Είναι δυνατόν να συμβούν και άλλες λιγότερο συχνές (~5%) ανακατατάξεις.

Τα θηλώδη καρκινώματα με ανακατατάξεις RET/PTC εμφανίζονται κυρίως σε νεαρότερη ηλικία και έχουν κλασική θηλώδη ιστολογία. Η συσχέτιση των ανακατατάξεων αυτών με την πρόγνωση των θηλωδών καρκινωμάτων παραμένει ακόμη ασαφής. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι οι όγκοι που φέρουν αναδιάταξη RET / PTC3 μπορεί να είναι επιρρεπείς σε αποδιαφοροποίηση και να έχουν πιο επιθετική συμπεριφορά.

- **Μεταλλάξεις στα γονίδια RAS**

Η οικογένεια των ανθρώπινων γονιδίων RAS περιλαμβάνουν τα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS. Αυτά κωδικοποιούν υψηλής συγγένειας πρωτεΐνες G, οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και διαδίδουν σήματα τα οποία προέρχονται από τον μεμβρανικό υποδοχέα-κινάση τυροσίνης και από τους υποδοχείς που συζεύγνυνται με πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptors, GPCR) μέσω των μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT. Οι σημειακές μεταλλάξεις σε διακριτές περιοχές στο γονίδιο RAS (κωδικόνιο 12/13 και 61) είναι οι πιο κοινές γενετικές αλλαγές σε ανθρώπινους όγκους (Prior et al, 2012). Συγκεκριμένα στο καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις αφορούν τα γονίδια NRAS (κωδικόνιο 61) και HRAS (κωδικόνιο 61). Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται με ποικίλη συχνότητα σε FTC. Επίσης, στα PTC, οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται κυρίως στον θυλακιώδη υπότυπο (FVPTC) με συχνότητα 10-20% (Nikiforova et al., 2009).

Η ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων παρέχει ισχυρά πειστήρια για νεοπλασία, παρόλο που δεν μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη κακοήθειας (Hara et al, 1994). Συμπερασματικά, η ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών αποτελεί έναν ισχυρό δείκτη για την διάγνωση του FVPTC και του FTC, οι οποίοι δεν μπορούν να διαγνωσθούν εύκολα, ειδικότερα σε δείγματα FNA.

- **Ανακατάταξη PAX8/PPARγ**

Η ανακατάταξη αυτή είναι αποτέλεσμα της μετατόπισης t(2;3) q(13;p25) η οποία οδηγεί στη σύντηξη του γονιδίου PAX8, το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα με το γονίδιο PPARγ (ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων, peroxisome proliferator-activated receptors). Η ανακατάταξη αυτή βρίσκεται στο 30-40% των CFTC και στο 38% των FVPTC (Castro et al., 2006) και οδηγεί στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης PPARγ, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοϊστοχημεία. Συνήθως οι όγκοι που φέρουν αυτή την ανακατάταξη εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία και είναι μικρότεροι σε μέγεθος (Nikiforova et al., 2002). Τέλος, η ανακατάταξη αυτή όσο και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο RAS σπάνια βρίσκονται

ταυτόχρονα στους ίδιους όγκους (Nikiforova et al., 2009) γεγονός που υποδηλώνει ότι τα FCT μπορούν να αναπτυχθούν μέσω 2 διαφορετικών μοριακών μονοπατιών.

### **1.5 Τελομερή και τελομεράση**

Ο ημι-συντηρητικός διπλασιασμός του DNA αρχίζει με κατεύθυνση 5' προς 3' με τον εκκινητή RNA και το ένζυμο DNA πολυμεράση και συνεχίζεται μέχρι το γραμμικό άκρο του χρωμοσώματος στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων μικραίνουν μετά από κάθε επιτυχή διπλασιασμό. Παρ'όλα αυτά, ολόκληρη η γενετική πληροφορία στα χρωμοσώματα διπλασιάζεται στα φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα και τα χρωμοσώματα παραμένουν σταθερά χωρίς συγχώνευση. Ο λόγος για αυτό το φαινόμενο είναι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται τελομερή που υπάρχουν στα χρωμοσωμικά άκρα. Έτσι, τα τελομερή χρησιμεύουν ως προστατευτικές ασπίδες για τα χρωμοσώματα στους ευκαρυώτες. Τα τελομερή συντίθενται από ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο που καλείται τελομεράση, το οποίο προσθέτει διαδοχικές επαναλήψεις μιας τελομερικής αλληλουχίας DNA στο άκρο του κάθε χρωμοσώματος. Οι μεταβολές τόσο στα τελομερή όσο και στην τελομεράση έχουν βιολογική και κλινική σημασία καθώς παρατηρούνται σε πολλές ασθένειες.

#### **1.5.1 Τελομερή**

Το τελομερές είναι ένα σύμπλεγμα DNA και πρωτεΐνης και διατηρείται στο τελομερικό DNA σε διαφορετικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι τελομερικές αλληλουχίες αποτελούνται από μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία δίκλωνου DNA (TTAGGG στον άνθρωπο), η οποία είναι μικρού μεγέθους και πλούσια σε κατάλοιπα G. Αυτή η πλούσια σε G αλυσίδα προεξέχει και σχηματίζει μία μονόκλωνη προεξοχή πλούσια σε κατάλοιπα G που ονομάζεται G-ουρά. Το μήκος των επαναλαμβανόμενων τελομερικών αλληλουχιών ποικίλει μεταξύ των ειδών και επηρεάζεται από την ηλικία και τις πιθανές ασθένειες.

Οι πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα των τελομερών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: πρωτεΐνες που συνδέονται άμεσα με το τελομερικό DNA και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες δέσμευσης. Στον άνθρωπο, το πιο σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό είναι το shelterin. Το shelterin είναι ένα σύμπλεγμα έξι πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες TIN2, Rap1, TPP1 και POT1 και τους παράγοντες δέσμευσης στις επαναλήψεις TTAGGG, TRF1, TRF2 (de Lange, 2005).

Η διατήρηση του μήκους των τελομερών μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους και η ιδιότητα αυτή αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου. Η επιμήκυνση με τη μεσολάβηση της τελομεράσης είναι η κυρίαρχη οδός στον άνθρωπο. Ωστόσο, έχουν εντοπιστεί πρόσθετοι μηχανισμοί σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται στα τελομερή και οι πρωτεΐνες απόκρισης σε βλάβη του

DNA παίζουν επίσης ρόλο στη συντήρηση των τελομερών. Στον άνθρωπο, η TRF1 μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά το μήκος των τελομερών επηρεάζοντας την τελομεράση και η πρωτεΐνη Rap1 παίζει ρόλο στη ρύθμιση του μήκους των τελομερών (Longhese, 2008).

### **1.5.2 Τελομεράση**

Η τελομεράση ταυτοποιήθηκε ως μία καταλυτική μονάδα για την επέκταση των τελομερικών αλληλουχιών στην *Tetrahymena*, από την Elizabeth Blackburn, την Carol Greider και τον Jack Szostak, οι οποίοι βραβεύτηκαν με Νόμπελ το 2009 (Blackburn et al., 1978).



**Εικόνα 9:** (Α) Η CryoEM δομή της τελομεράσης στην *Tetrahymena*. (Β) Το πρωτόζωο *Tetrahymena*.

Η τελομεράση είναι μία ριβονουκλεοπρωτεϊνική πολυμεράση η οποία διατηρεί τα άκρα των τελομερών προσθέτοντας την αλληλουχία TTAGGG. Το ένζυμο αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό συστατικό με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο TERT και από ένα συστατικό RNA (hTR) το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την τελομερική επανάληψη. Η έκφραση της τελομεράσης παίζει σημαντικό ρόλο στη γήρανση των κυττάρων, καθώς φυσιολογικά η έκφρασή της καταστέλλεται στα ενήλικα σωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη σταδιακή βράχυνση των τελομερών και τελικά τη μείωση των τελομερών (Allsopp et al., 1995). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα τελομερή των χρωμοσωμάτων φυσιολογικά τείνουν να γίνονται όλο και βραχύτερα με τη πάροδο των κυτταρικών διαιρέσεων, φτάνοντας σε ένα κρίσιμο μήκος. Όταν η τελομεράση συνεχίζει να εκφράζεται στα κύτταρα, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να υπερβούν το όριο Hayflick και να γίνουν δυνητικά αθάνατα, όπως συναντάται σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Το όριο Hayflick ή αλλιώς φαινόμενο Hayflick είναι ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων που επιτελεί ένας φυσιολογικός αριθμός ανθρώπινων κυττάρων έως ότου σταματήσει η κυτταρική διαίρεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο της τελομεράσης εκτός από το TERT και το πρότυπο RNA έχει και άλλα συστατικά, όπως για παράδειγμα την δυσκερίνη. Η πρωτεΐνη δυσκερίνη συνδέεται στο hTR και βοηθά στη σταθεροποίηση

του συμπλόκου της τελομεράσης, συμμετέχοντας τελικά στη διατήρηση των τελομερών.

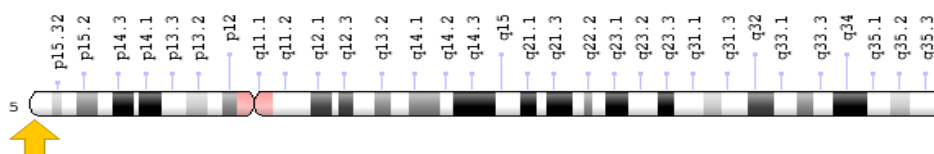
Στους περισσότερους τύπους κυττάρων, η τελομεράση είναι είτε μη ανιχνεύσιμη είτε βρίσκεται ενεργή σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Υψηλή έκφραση της τελομεράσης παρατηρείται σε κύτταρα του αναπτυσσόμενου εμβρύου, όπως σε κύτταρα του μυελού των οστών, πνευμόνων και γαστρεντερικού σωλήνα και επιτρέπει στα κύτταρα αυτά να πολλαπλασιάζονται πολλές φορές χωρίς να καταστραφούν ή χωρίς να οδηγηθούν σε απόπτωση. Επίσης, υψηλές ποσότητες ενεργής τελομεράσης συναντώνται στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, τα οποία μεγαλώνουν και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Τέλος, η εισαγωγή του TERT σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ινοβλάστες συνοδεύεται με δραστικότητα τελομεράσης, επιμήκυνση τελομερών, συνεχή πολλαπλασιασμό και μειωμένη γήρανση, υποδεικνύοντας ότι το TERT είναι η υπομονάδα περιορισμού της ταχύτητας του ολοενζύμου τελομεράσης (Liu et al., 2000).

### **1.5.3 Τελομεράση και ο βιολογικός της ρόλος στην ογκογένεση**

Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποκτήσουν την ικανότητα απεριόριστης αναπαραγωγής και διαίρεσης διατηρώντας το μήκος των τελομερών. Στην συντριπτική πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων και των αθάντων κυττάρων η τελομεράση ξανα-ενεργοποιείται (Bodnae et al., 1998). Ενδεικτικά η δραστικότητα της είναι ανιχνεύσιμη στο 85% έως 90% των ανθρώπινων όγκων και καρκινικών κυτταρικών σειρών (Kim et al., 1994). Η ενεργοποίηση της τελομεράσης έχει μεγάλη σημασία για διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές και έχει θεωρηθεί σημαντικός κλινικός βιοδείκτης για διαφορετικούς τύπους όγκων. Μία ελκυστική στρατηγική για αντικαρκινική θεραπεία είναι η χρήση αναστολέων τελομεράσης, οι οποίοι εμποδίζουν την αποκατάσταση των τελομερών και τελικά οδηγούν το κύτταρο σε θάνατο.

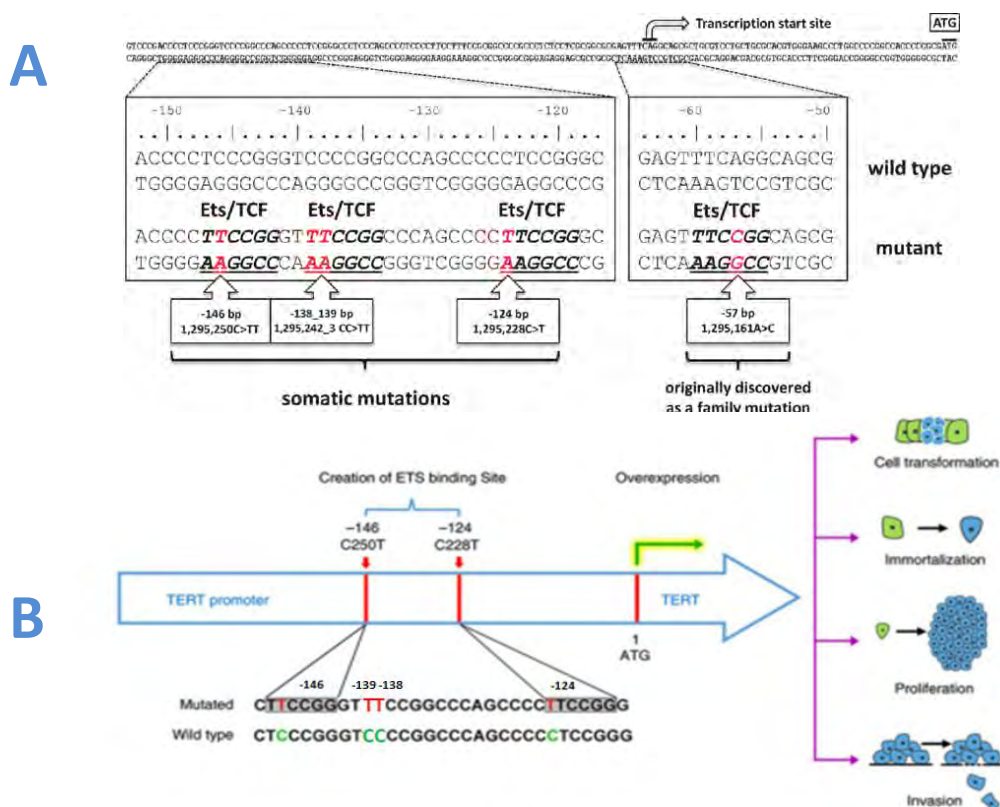
### **1.5.4 Το γονίδιο TERT**

Το ανθρώπινο γονίδιο TERT, που αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια, παρουσιάζεται ως μοναδικό αντίγραφο και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5p15.33 και εκτείνεται πάνω από 40kb (Cong et al., 1999) .



**Εικόνα 10 :** Η θέση του γονιδίου TERT στο χρωμόσωμα 5, (p βραχίονα θέση 15.33).

Οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο TERT είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό του καρκίνου. Η μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου TERT αναφέρθηκε αρχικά στο ανθρώπινο μελάνωμα (Huang et al., 2013). Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 11 Α και Β, υπάρχουν κυρίως δύο μεταλλάξεις που οδηγούν σε μετατροπή της κυτοσίνης σε θυμίνη (C > T), οι οποίες εντοπίζονται στις θέσεις -124 και -146 bp από την θέση ATG και ονομάζονται C228T και C250T αντίστοιχα. Επίσης διακρίνεται και μία τρίτη σωματική μετάλλαξη στις θέσεις -139 και -138bp στις οποίες η κυτοσίνη και στις 2 θέσεις μετατρέπεται σε θυμίνη (CC>TT) και ονομάζονται ως C243T και C242T. Όλες οι παραπάνω γενετικές αλλαγές δημιουργούν ένα νέο μοτίβο σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων ETS (E26 - transformation specific) το οποίο διεγείρει την μεταγραφή του γονιδίου TERT. Εκτός από αυτές, συμβαίνουν και άλλες μεταλλάξεις σε πιο χαμηλές συχνότητες, όπως η μετάλλαξη C>T στη θέση -57bp που επίσης δημιουργεί νέες θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Αν και οι συχνότητες των μεταλλάξεων ποικίλουν μεταξύ των διάφορων τύπων καρκίνου, οι ενδοκρινικοί όγκοι, οι καρκίνοι του ήπατος, οι καρκίνοι της νεφρικής πυέλου, τα γλοιώματα, τα γλοιοβλαστώματα και οι καρκίνοι του δέρματος παρουσιάζουν υψηλές συχνότητες μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT (Scott et al., 2014).



**Εικόνα 11 :** (Α,Β) Απεικονίζονται οι σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή της τελομεράσης, -146bp (C250T) , -139 -138bp (C243T,C242T) και -124bp (C228T) και οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων ETS. (Β) Παρουσιάζονται οι συνέπειες αυτών των μεταλλάξεων, που είναι η κυτταρική

διαφοροποίηση, η αθανатоποίηση, ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διείσδυση.

#### **1.5.4.1 Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς.**

Στους ανθρώπινους καρκίνους οι πιο κοινές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT είναι οι C228T και C250T. Τα αποτελέσματα αρκετών μελετών αναδεικνύουν ότι δεν συνυπάρχουν ταυτόχρονα οι γενετικές αλλαγές C228T και C250T στο γονίδιο TERT. Επίσης φαίνεται ότι η μετάλλαξη C228T είναι πολύ πιο διαδεδομένη από την C250T στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Συγκεκριμένα η μελέτη κατανομής των μεταλλάξεων TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος έδειξε ότι το ποσοστό των C228T και C250T είναι 9,7% και 2,1% σε PTC, 15,7% και 2,5% σε FTC, 33,8% και 15,0% σε PDTC, 37,7% και 4,1% σε ATC αντίστοιχα. Δεν βρέθηκε ωστόσο μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου TERT σε MTC. Το πρότυπο εμφάνισης των μεταλλάξεων φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από το γεωγραφικό υπόβαθρο και την εθνικότητα (Liu et al., 2016).

Επίσης άλλες μελέτες ανέδειξαν ότι αθροιστικά οι μεταλλάξεις C228T και C250T είναι απύσες σε καλοήθεις όγκους θυρεοειδούς (0%), ενώ απαντώνται με ποσοστό 38-46% σε PDTC και ATC και 12-14% σε PTC και FTC (Liu et al., 2013b). Από το σύνολο των 363 καλοήθων νεοπλασμάτων θυρεοειδούς, μόνο ένα δείγμα αναφέρθηκε ότι φέρει τη σημειακή μετάλλαξη του υποκινητή TERT (C228T). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος ασθενής με καλοήγη καρκίνο του θυρεοειδούς και με μετάλλαξη στο γονίδιο TERT σε μετέπειτα στάδιο επανεμφάνισε όγκο και πέθανε λόγω FTC, εγείροντας ερωτήσεις σχετικά με την ιστολογική προέλευση του καλοήθους όγκου.

Η μετάλλαξη στον υποκινητή TERT είναι ένα σπάνιο γενετικό συμβάν στο θηλώδες θυρεοειδικό μικροκαρκίνωμα (Papillary thyroid microcarcinomas, PTMC). Η μελέτη των de Biase et al. (2015) που εξέτασε 431 PTMC έδειξε ότι οι μεταλλάξεις στον υποκινητή TERT απαντώνται σε ποσοστό 4,7%.

Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή TERT φαίνεται να είναι επίσης ασυνήθιστες σε παιδιατρικούς καρκίνους του θυρεοειδούς όπως υποδεικνύεται από τη μελέτη των Ballester et al. (2015), που δεν βρήκαν καμία μετάλλαξη στον υποκινητή TERT σε 27 παιδιατρικούς καρκίνους του θυρεοειδούς, συμπεριλαμβανομένων 25 PTC, 1 FTC και 1 MTC. Επιπλέον μελέτες για τον παιδικό καρκίνο του θυρεοειδούς, ωστόσο, απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτό το εύρημα, λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Η μελέτη του Liu et al., 2013b έδειξε μια κατανομή επικράτησης των μεταλλάξεων του υποκινητή TERT μεταξύ των τριών βασικών κατηγοριών του PTC. Αρκετές μεταγενέστερες μελέτες ανέλυσαν το μοτίβο κατανομής των μεταλλάξεων αυτών και γενικά βρήκαν ότι εμφανίζονταν περισσότερο στο TCPTC (Lee et al., 2015). Συγκεκριμένα, η επικράτηση των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης είναι 25% σε TCPTC, 9,6% σε CPTC και 8% σε FVPTC.

Η παρουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT παρέχει γενετικούς μηχανισμούς για την υπερέκφραση του γονιδίου στον καρκίνο του θυρεοειδούς, δεδομένου ότι αυτές οι μεταλλάξεις δημιουργούν θέσεις δέσμευσης στον υποκινητή για τους μεταγραφικούς παράγοντες ETS (Horn et al., 2013, Huang et al., 2013, Bell et al., 2015), οι οποίοι με τη σειρά τους οδηγούν σε υπερέκφραση του γονιδίου TERT. Στην πραγματικότητα, δύο μελέτες έδειξαν μια άμεση συσχέτιση των μεταλλάξεων στον υποκινητή με αυξημένη έκφραση TERT σε καρκίνους του θυρεοειδούς (Vinagre et al., 2013 και Muzza et al., 2015).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου TERT (knock-down) χρησιμοποιώντας την αντινοσηματική προσέγγιση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα θυρεοειδούς ανέστειλε τη δραστηριότητα της τελομεράσης *in vitro* και μείωσε την ανάπτυξη όγκων *in vivo* (Teng et al., 2003), παρέχοντας σημαντικά στοιχεία για τον ρόλο του TERT στην ογκογένεση του θυρεοειδούς. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ένα σημαντικό ρόλο των μεταλλάξεων του υποκινητή TERT στην ογκογένεση του θυρεοειδούς.

Έχει μελετηθεί επίσης η σχέση των μεταλλάξεων στον υποκινητή της τελομεράσης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (Liu and Xing, 2016). Οι μεταλλάξεις συναντώνται συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και κυρίως σε άρρενες με ποσοστό εμφάνισης 37,4%. Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή της τελομεράσης τέλος σχετίζονται με μεγάλους μεγέθους όγκους, με εξωθυρεοειδική εισβολή, με μετάσταση σε μακρινά σημεία και θυρεοειδικό καρκίνο III/IV σταδίου.

#### **1.5.4.2 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης με τις μεταλλάξεις RAS στον θυρεοειδικό καρκίνο.**

Οι μεταλλάξεις RAS είναι μείζονες γενετικές ογκογενετικές τροποποιήσεις και εμφανίζονται κυρίως στους τύπους θυρεοειδικού καρκίνου FTC, PDTC και ATC. Αρκετές μελέτες εξέτασαν τη σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων RAS και των μεταλλάξεων του υποκινητή TERT στον θυρεοειδικό καρκίνο (Vinagre et al. 2013). Μία μοναδική μελέτη σε τύπο FTC έδειξε μία εμφανή συσχέτιση των 2 αυτών διαφορετικών μεταλλάξεων. Άλλες μελέτες (Saji & Ringel, 2010) έδειξαν ξεχωριστά μία τάση τέτοιας συσχέτισης. Τα δεδομένα από τύπους PDTC και ATC έδειξαν επίσης μία σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων RAS και των μεταλλάξεων του υποκινητή TERT. Είναι πιθανό ότι η συνύπαρξη αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να παίζει ένα συνεργιακό ρόλο στην ογκογένεση του θυρεοειδούς αδένος και τελικά να προάγουν την επιθετικότητα του όγκου. Παρόλα αυτά η σχέση μεταξύ αυτών των ειδών μεταλλάξεων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

#### **1.5.4.3 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης με τη μετάλλαξη BRAF V600E στον θυρεοειδικό καρκίνο.**

Το BRAF V600E είναι το πιο συνηθισμένο ογκογονίδιο στον καρκίνο του θυρεοειδούς και παίζει βασικό ρόλο στην ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του

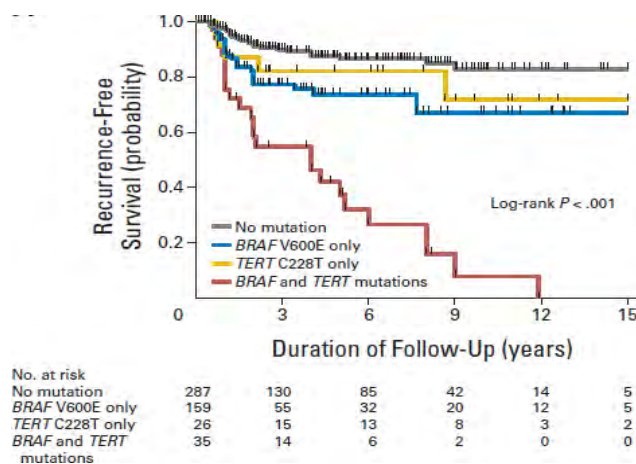


θυρεοειδούς, ιδιαίτερα του PTC (Xing 2005, 2007). Οι μελέτες σχετικά με τις μεταλλάξεις στον υποκινητή της τελομεράσης TERT στον καρκίνο του θυρεοειδούς οδήγησαν στην ανακάλυψη μίας ιδιαίτερης σχέσης των μεταλλάξεων αυτών με τη μετάλλαξη BRAF V600E σε όγκους PTC (Liu et al., 2013b). Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις στον υποκινητή TERT βρίσκονται στο 11,3% των περιπτώσεων που δεν είχαν την μετάλλαξη BRAF V600E έναντι 17,8% των περιπτώσεων που έφεραν την μετάλλαξη BRAF V600E. Αντίστροφα, η μετάλλαξη BRAFV600E απαντάται στο 44,1% των δειγμάτων που δεν εμφάνιζαν τις μεταλλάξεις TERT έναντι 57,4% των δειγμάτων που έφεραν κάποια μετάλλαξη TERT.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο σε PTC ή σε προχωρημένους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς, PDTC και ATC. Συγκεκριμένα, για τους όγκους PTC, οι μεταλλάξεις στον υποκινητή TERT βρίσκονται στο 7,1% των ασθενών που δεν έφεραν την μετάλλαξη BRAFV600E έναντι 15,4% που είχαν την μετάλλαξη BRAFV600E. Αντιστρόφως, το BRAFV600E βρίσκεται στο 47,3% των περιπτώσεων που ήταν αρνητικά για τις μεταλλάξεις TERT έναντι 68,1% των δειγμάτων που ήταν θετικά για κάποια μετάλλαξη TERT (Liu et al., 2013b). Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή TERT στους τύπους PDTC και ATC βρίσκονταν στο 34% των περιπτώσεων που δεν έφεραν την μετάλλαξη BRAFV600E έναντι 58,2% των περιπτώσεων που περιείχαν την μετάλλαξη BRAFV600E. Αντιστρόφως, η μετάλλαξη BRAFV600E βρίσκεται στο 15,2% των δειγμάτων που δεν είχαν την μετάλλαξη TERT έναντι 32,7% των δειγμάτων που είχαν κάποια μετάλλαξη TERT. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η συνύπαρξη των μεταλλάξεων BRAFV600E και TERT αποτελεί ένα μοναδικό γενετικό υπόβαθρο και οδηγεί σε ιδιαίτερα επιθετική παθογένεια και κακές κλινικές εκβάσεις του PTC (Xing et al., 2014a). Σ' αυτή τη μελέτη, όταν οι ασθενείς με PTC χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: (1) χωρίς μετάλλαξη, (2) μετάλλαξη μόνο BRAF V600E, (3) μετάλλαξη μόνο του υποκινητή TERT και (4) συνύπαρξη των δύο μεταλλάξεων, η ομάδα και με τις δύο μεταλλάξεις συσχετίστηκε πολύ περισσότερο με σχεδόν όλους τους παράγοντες υψηλού κινδύνου όπως μεγάλο μέγεθος όγκου, εξωθυρεοειδής εισβολή, αγγειακή εισβολή, μακρινές μεταστάσεις και προχωρημένα στάδια III / IV συγκριτικά με τις άλλες ομάδες.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις BRAF και TERT συνεργάζονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Ngeow & Eng, 2014). Ένας μοριακός μηχανισμός για να εξηγήσει αυτό το συνεργιακό αποτέλεσμα της συνύπαρξης των μεταλλάξεων BRAF V600E και TERT είναι ότι, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Liu et al., 2013b, Xing et al., 2014a), το μονοπάτι των MAPK που ενεργοποιείται από τη BRAF V600E οδηγεί στην υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ETS, οι οποίοι μπορούν στη συνέχεια να δεσμευθούν στη θέση σύνδεσης στον υποκινητή TERT που δημιουργήθηκε με μετάλλαξη C228T ή C250T ή C243T, C242T για να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδίου TERT. Δεδομένου ότι η BRAF V600E έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις ογκογονικές εξωκυτταρικές μικροπεριβαλλοντικές αλλαγές στην

παθογένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς (Nucera et al., 2010, 2011, Nucera 2013), θα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διερευνηθούν αυτές οι αλληλεπιδράσεις.



**Διάγραμμα 2:** Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων BRAFV600E, TERT και της συνύπαρξής τους σε ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Με γκρι χρώμα απεικονίζεται η επιβίωση των ασθενών, οι οποίοι δεν έφεραν αυτές τις μεταλλάξεις, με κίτρινο αυτοί που έφεραν την μετάλλαξη TERT C228T, με μπλε οι ασθενείς με την μετάλλαξη BRAFV600E και τέλος με κόκκινο οι ασθενείς που έφεραν και τις 2 μεταλλάξεις.

### 1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση των θυρεοειδικών καρκίνων.

Είναι σημαντικό τόσο για την πρόγνωση όσο και για την αντιμετώπιση των θυρεοειδικών καρκίνων να ληφθούν υπόψη οι παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενούς, ο τύπος του θυρεοειδικού καρκίνου, το στάδιο του καρκίνου, εάν ο καρκίνος έχει πλήρως αφαιρεθεί με χειρουργείο, εάν ο ασθενής έχει πολλαπλή ενδοκρινή διαταραχή τύπου 2B (MEN 2B), η γενική υγεία του ασθενούς και τέλος εάν υπάρχει επανεμφάνιση του καρκίνου. Η αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους. Ενδεικτικά, με χειρουργική επέμβαση (1), με ακτινοβολία, ειδικότερα θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (2) και με στοχευμένη θεραπεία (3). Στις περισσότερες περιπτώσεις για την αντιμετώπιση των θυρεοειδικών όγκων προτιμάται κυρίως η χειρουργική επέμβαση. Ειδικότερα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε λοβεκτομή, κατά την οποία αφαιρείται ο λοβός στον οποίο βρέθηκε ο καρκίνος. Επίσης, μπορεί να γίνει ολική ή μερική θυρεοειδεκτομή, όπου αφαιρείται όλος ο θυρεοειδής αδένος ή μέρος αυτού αντίστοιχα και χορήγηση T4 θυρεοειδικής ορμόνης.

Σχετικά με την θεραπεία με ακτινοβολία (radiation therapy), η χρήση υψηλής ενέργειας ακτίνων X ή άλλων ειδών ακτινοβολιών έχει ως στόχο να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, διακρίνονται 2 τύποι θεραπείας με ακτινοβολία, η

εξωτερική (external radiation therapy) και η εσωτερική (internal radiation therapy). Κατά την εξωτερική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται ένα μηχάνημα το οποίο στέλνει ακτινοβολία άμεσα στον καρκίνο, ενώ κατά την εσωτερική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται ένα ραδιενεργό υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται είτε σε βελόνες, είτε σε καθετήρες το οποίο τοποθετείται στον καρκίνο. Σε περιπτώσεις θηλωδών και θυλακιωδών θυρεοειδικών όγκων προτιμάται η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (Radioactive Iodine therapy , RAI). Το ιώδιο είναι ένα σημαντικό συστατικό για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών και δεδομένου ότι οι περισσότεροι θυρεοειδείς αδένες χρειάζονται το ιώδιο, χορηγώντας ραδιενεργό ιώδιο ο θυρεοειδής μπορεί να καταστραφεί. Το RAI λαμβάνεται από το στόμα και κατανέμεται τόσο σε θυρεοειδικούς ιστούς όσο και σε απομακρυσμένα σημεία που φέρουν καρκινικά κύτταρα και έχει ως σκοπό να καταστρέψει τον ιστό του θυρεοειδούς αδένος και να σκοτώσει τελικά τα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα, χωρίς να βλάψει άλλους ιστούς. Πολλές φορές η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, με στόχο να σκοτώσει εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα. Στους τρόπους αντιμετώπισης των θυρεοειδικών καρκίνων τέλος ανήκει και η στοχευμένη θεραπεία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται φάρμακα τα οποία αναγνωρίζουν και τελικά επιτίθενται ειδικά σε καρκινικά κύτταρα και όχι σε φυσιολογικά κύτταρα. Ειδικότερα η θεραπεία με τη χρήση αναστολέων κινάσης τυροσίνης, εμποδίζει τη διάδοση σημάτων για την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το φάρμακο Sorafenib, το οποίο είναι ένας τέτοιος αναστολέας και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που οι ασθενείς φέρουν τις μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF.

## **2. Στόχος**

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μεταλλάξεων στον υποκινητή της τελομεράσης στις θέσεις -146 bp (C250T), -139 (C243T), -138 bp (C242T) και -124 bp (C228T), σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

### **3. Μέθοδοι και Υλικά**

#### **3.1 Δείγματα ασθενών**

Η μελέτη των μεταλλάξεων του υποκινητή της τελομεράσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε βιοψίες ασθενών. Η βιοψία είναι ένας απομονωμένος ιστός από την επιθυμητή περιοχή, η οποία ακολούθως εξετάζεται στο μικροσκόπιο για την ύπαρξη ή μη κακοήθειας. Η απομόνωση ιστού από τον θυρεοειδή αδένα μπορεί να πραγματοποιηθεί αρχικά με τη χρήση μιας λεπτής βελόνας, διαδικασία που ονομάζεται παρακέντηση με τη χρήση λεπτής βελόνας (Fine Needle Aspiration , FNA). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η βελόνα εισέρχεται μέσω του δέρματος στον θυρεοειδή αδένα και συλλέγει ένα αριθμό δειγμάτων ιστού από διάφορα σημεία. Τέλος, οι ιστοί μπορούν να απομονωθούν και από θυρεοειδικά οζίδια ή από κάποιον λοβό, τα οποία πρώτα αφαιρούνται με χειρουργική επέμβαση. Στην παρούσα εργασία οι βιοψίες των ασθενών προέκυψαν από όγκους μετά από ολική ή μερική θυρεοειδεκτομή και προήλθαν από το παθολογοανατομικό εργαστήριο του νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ. Συνολικά μελετήθηκαν 37 δείγματα από ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, που περιλαμβάνουν 18 θηλώδη, 14 θηλώδη καρκινώματα θυλακιώδους υποτύπου, 4 θυλακιώδη και 1 μυελοειδές καρκίνωμα. Τα δείγματα προέρχονται από ασθενείς ηλικίας 25 έως 83 ετών ( $48,22 \pm 15,95$ ).

**Πίνακας 2:** Δημογραφικά στοιχεία των δειγμάτων ανάλογα με τον τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς.

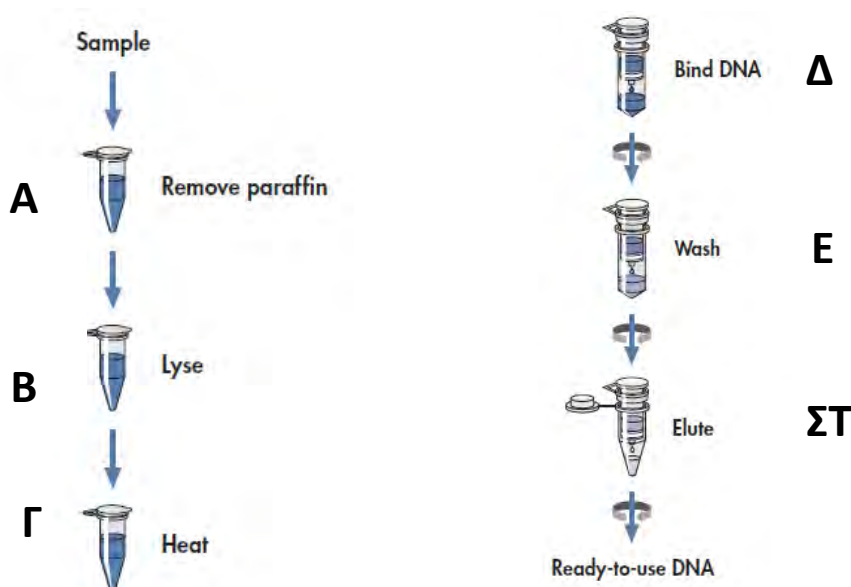
Τύπος καρκίνου	Αριθμός δειγμάτων	Φύλο	Ηλικία
Θηλώδες	18	15 ΘΗΛΥ   3 ΑΡΡΕΝ	$43,61 \pm 15,85$
Θυλακιώδους υποτύπος	14	14 ΘΗΛΥ	$49,79 \pm 13,13$
Θυλακιώδες	4	4 ΘΗΛΥ	$63 \pm 16,69$
Μυελοειδές	1	1 ΘΗΛΥ	55

#### **3.2 Μέθοδοι**

##### **3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών.**

Για την απομόνωση γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit (50), με αριθμό καταλόγου 56404. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βιοψίες ιστού σταθεροποιημένες με φορμαλίνη και εγκλεισμένες σε παραφίνη (Formalin fixed paraffin embedded, FFPE). Αρχικά, χρησιμοποιούνται 1-2 τομές του ιστού, με πάχος περίπου 5-10  $\mu\text{m}$ . Σε περίπτωση που η επιφάνεια έχει εκτεθεί στον αέρα, αφαιρούνται οι πρώτες 2-3 τομές. Με ένα νυστέρι αφαιρείται προσεκτικά η παραφίνη του δείγματος, προστίθεται 1ml ξυλένιο και γίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex) για 10

δευτερόλεπτα. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στα 11.000 x g. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται ίδια ποσότητα αιθανόλης (99,8%) (Εικόνα 12 Α). Γίνεται ξανά vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στα 11.000 x g. Ακολούθως, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται επώαση στους 37°C με ανοιχτό το καπάκι μέχρι να εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης. Ακολούθως, το δείγμα επαναιωρείται σε 180 µl διάλυμα ATL και σε 20 µl πρωτεϊνάσης K (τελικής συγκέντρωσης 20 mg/ml) και αναδεύεται στο vortex για 10 δευτερόλεπτα. Εν συνεχεία επωάζεται στους 56 °C με συνεχή ανάδευση μέχρι να λυθεί πλήρως ο ιστός για 24 ώρες. Σε περίπτωση που ο ιστός δεν έχει πραγματοποιηθεί η πλήρης λύση του ιστού προστίθενται ακόμη 10 µl πρωτεϊνάσης K και γίνεται επώαση για ακόμη 1 ώρα (Εικόνα 12 Β). Ακολουθεί επώαση στους 90°C για 1 ώρα και σύντομη φυγοκέντρωση για 1 δευτερόλεπτο στα 11.000 x g (Εικόνα 12 Γ). Έπειτα προστίθενται 200 µl διάλυμα AL και γίνεται vortex. Προστίθεται μετά ίδια ποσότητα αιθανόλης και ξανά γίνεται ισχυρή ανακίνηση. Ύστερα το κυτταρόλυμα μεταφέρεται προσεκτικά σε μία στήλη και φυγοκεντρείται στα 10.000 x g για 1 λεπτό (Εικόνα 12 Δ). Η στήλη έπειτα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι χωρητικότητας 2ml, προστίθενται 500 µl διάλυμα AW1 προσεκτικά και ξανά γίνεται φυγοκέντρωση στα 10.000 x g για 1 λεπτό. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι των 2ml και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται αυτή τη φορά με διάλυμα AW2 (Εικόνα 12 Ε). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 11.000 x g για 3 λεπτά και μεταφορά της στήλης σε σωληνάκι χωρητικότητας 1.5 ml. Προστίθενται 25 µl διάλυμα ATE, το δείγμα επωάζεται για 5 λεπτά και τελικά φυγοκεντρείται στα 11.000 x g για 1 λεπτό (Εικόνα 12 ΣΤ). Το DNA αποθηκεύεται στους -20 °C.



**Εικόνα 12:** Τα στάδια της απομόνωσης γενωμικού DNA από τομές ιστού.

### **3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μία *in vitro* μέθοδος η οποία ανακαλύφθηκε το 1980 από τον Kevin Mullis. Επιτρέπει την παραγωγή ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Τα προϊόντα της PCR ονομάζονται απλικόνια (amplicons). Η PCR είναι πλέον ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της PCR θα πρέπει να είναι ήδη γνωστές ορισμένες πληροφορίες για την αλληλουχία-στόχο, ώστε να είναι εφικτή η σύνθεση των εκκινητών. Η PCR αρχίζει αρχικά με την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία στόχο, δηλαδή την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με πολλαπλούς γύρους αντιγραφής της αλληλουχίας-στόχου, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στα άκρα της αλληλουχίας στόχου σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Οι εκκινητές έχουν συνήθως μήκος 20 νουκλεοτιδίων και συντίθενται σε κατάλληλα μηχανήματα. (Russel, 2014).

Η διαδικασία που ακολουθείται σε μία αντίδραση PCR είναι η εξής:

1. Το δίκλωνο DNA το οποίο φέρει την αλληλουχία στόχο αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C για 15 λεπτά ή 5 λεπτά ανάλογα το ένζυμο που χρησιμοποιείται.
2. Ακολουθεί θέρμανση πάλι στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα.
3. Έπειτα ακολουθεί ψύξη του μείγματος της αντίδρασης στους 62 °C για 1 λεπτό. Κατά το στάδιο αυτό, οι εκκινητές προσδένονται στο αποδιαταγμένο DNA. Οι δύο εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε, στην κατάλληλη θερμοκρασία, ο καθένας να προσδένεται με υψηλή ειδικότητα σε μία από τις 2 αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, στα άκρα της αλληλουχίας η οποία πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η πρόσδεση γίνεται με τέτοιο προσανατολισμό, ώστε τα 3' άκρα των εκκινητών να είναι στραμμένα προς το εσωτερικό της αλληλουχίας στόχου.
4. Κατόπιν, το μείγμα θερμαίνεται στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό, οι εκκινητές επιμηκύνονται από μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.
5. Τα στάδια 2 έως 4 επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους συνολικά.
6. Το μείγμα θερμαίνεται στους 72 °C για 7 λεπτά.
7. Παραμονή του δείγματος στους 4 °C για απεριόριστο χρόνο.

Οι εκκινητές και το γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία συνοψίζονται στους πίνακες 3 και 4 αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονισθεί ότι το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι στις 194bp.



**Πίνακας 3:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η αλληλουχία και η θερμοκρασία τήξεως τους.

Εκκινητές	Αλληλουχία	Θερμοκρασία $T_m$
Forward	5'-CACCCGTCCTGCCCTTCACCTT-3'	67 °C
Reverse	5'-GGCTTCCACGTGCGCAGCAGGA-3'	69 °C

**Πίνακας 4:** Η αλληλουχία του γενωμικού DNA, όπου με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο εκκινητής Forward, με κόκκινο χρώμα ο εκκινητής Reverse και με μωβ χρώμα οι θέσεις που εντοπίζονται οι C250T, C243T, C242T και C228T.

Αλληλουχία γενωμικού DNA
GCGCGGGCGGGGAAGCGCGGCCAGACCCCGGGTCCGCCCGGAGCAGCTGCGCTGTCGGG GCCAGGCCGGGCTCCAGTGGATTGCGGGGCACAGACGCCAGGACCGCGCTTCCACGTGG CGGAGGGACTGGGGACCCGGG <b>CACCGTCTGCGCCCTTCACTT</b> CCAGCTCCGCCTCCTCCGC GCGGACCCCGCCCGTCCCGACCCCT <b>C</b> CGGGT <b>CC</b> CGGCCAGCC <b>C</b> TCGGGGCCCTCCCA GCCCCTCCCTTCTCTTCCGCGGGCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCCAGGCAGCGCTG CG <b>TCCTGCTGCGCACGTGGGAAGCC</b> CTGGCCCCGGCCACCCCGCGATGCCGCGCGCTCCCC GCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCCACG TTCG

Συνοψίζοντας, ξεκινώντας από 1 μόριο DNA, μετά από ένα κύκλο παράγονται 2 μόρια, μετά από 2 κύκλους 4 και μετά από 3 κύκλους 8 μόρια, τα 2 από τα οποία έχουν μοναδιαίο μήκος και αποτελούν το επιθυμητό προϊόν. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε μία κατάλληλη συσκευή που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής και είναι ταχύτατη, καθώς κάθε κύκλος διαρκεί 1-3 λεπτά. Ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίζεται ώστε να πραγματοποιούνται οι απαραίτητες μεταβολές της θερμοκρασίας και το μείγμα της αντίδρασης να παραμένει στην κατάλληλη θερμοκρασία για όσο χρόνο χρειάζεται.

Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά ένζυμα, το Hot Star DNA polymerase (Qiagen – 203203) στις συνθήκες 1 και το ένζυμο Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems) στις συνθήκες 2 του πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση PCR.

<b>Αντιδραστήρια PCR 1</b>	<b>Αντιδραστήρια PCR 2</b>
Buffer 1x	Yellow buffer 1x
dNTPS 0.2mM	dNTPs 0.2mM
MgCl <sub>2</sub> 2.5mM	MgCl <sub>2</sub> 2.5mM
Forward primer 25 pmol	Forward primer 25 pmol
Reverse primer 25 pmol	Reverse primer 25 pmol
Q-solution 1x	DMSO 5%
<b>Hot Star DNA polymerase 1.25 U</b>	<b>Kapa Taq polymerase 2 U</b>
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O
DNA-καλούπι	DNA καλούπι

Για κάθε αντίδραση PCR παρασκευάζεται ένα μείγμα (mastermix), το οποίο περιέχει τα αντιδραστήρια στις τελικές συγκεντρώσεις του Πίνακα 5. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μl. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι για κάθε αντίδραση PCR υπάρχει και ένας αρνητικός μάρτυρας. Ο αρνητικός μάρτυρας περιλαμβάνει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια εκτός από το DNA. Στην θέση αυτού προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα σε νερό. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι απαραίτητος σε κάθε τέτοια αντίδραση, διότι ελέγχει την καθαρότητα των αντιδραστηρίων, δηλαδή την ύπαρξη ή μη επιμόλυνσης.

Τα προγράμματα για την αντίδραση της PCR που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

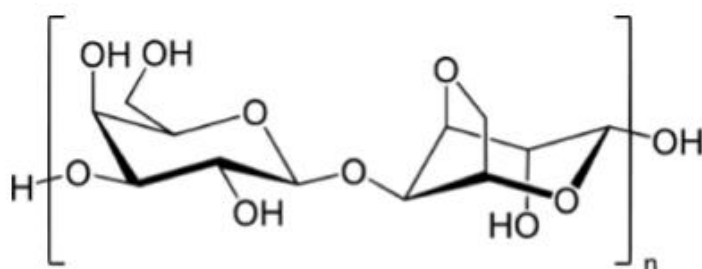
**Πίνακας 6:** Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

<b>Πρόγραμμα PCR 1 (Hot Star DNA polymerase)</b>	<b>Πρόγραμμα PCR 2 (Kapa Taq DNA polymerase)</b>
95° C για 15 λεπτά	95° C για 5 λεπτά
95° C για 30 δευτερόλεπτα 62° C για 1 λεπτό 72° C για 30 δευτερόλεπτα	95° C για 30 δευτερόλεπτα 62° C για 1 λεπτό 72° C για 30 δευτερόλεπτα
72° C, για 7 λεπτά	72° C για 7 λεπτά
4° C για απεριόριστο χρόνο	4° C για απεριόριστο χρόνο

### **3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία ευρέως διαδεδομένη ηλεκτροχημική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και

πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους πηκτώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα μόρια αυτά κινούνται μέσα στο πηκτώμα και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, διάφορα μηχανήματα επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, όπως για παράδειγμα έκθεση σε UV ή ειδικά συστήματα για τη λήψη ψηφιακών φωτογραφιών του πηκτώματος. Τα μόρια DNA μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν DNA με μήκος βάσεων μεταξύ 500 bp- 25 kb. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη και έχει ευρεία χρήση. Τα πηκτώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την ηλεκτροφόρηση ποικίλουν ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται.



**Εικόνα 13:** Απεικόνιση του πολυσακχαρίτη αγαρόζης.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε 2 στάδια, τα οποία είναι η παρασκευή του πηκτώματος και η τοποθέτηση των προς εξέταση δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

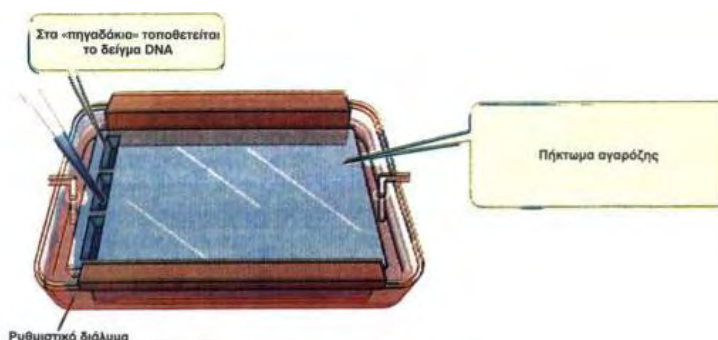
**Πίνακας 7:** Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτώμα αγαρόζης.

Αντιδραστήρια	Τελικές ποσότητες
Διάλυμα TAE	1x
Διάλυμα φόρτωσης	1x
Βρωμιούχο αιθίδιο	0.5 µg/ml
Μάρτυρας μοριακού βάρους	
Αγαρόζη	Ανάλογα την περιεκτικότητα του πηκτώματος

Αρχικά, τοποθετείται το καλούπι που θα χρησιμοποιηθεί στην κατάλληλη στηρικτική συσκευή. Τοποθετούνται στα κατάλληλα σημεία τα εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά βοθρία υποδοχής του δείγματος. Κατόπιν ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης, και ακολούθως αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE σε μία κωνική φιάλη και το μίγμα αυτό θερμαίνεται στο φούρνο

μικροκυμάτων σιγά σιγά μέχρι η αгарόζη να διαλυθεί και να προκύψει ένα διαφανές διάλυμα. Ακολούθως η κωνική φιάλη βρέχεται από τρεχούμενο νερό, για να κρυώσει και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Το μίγμα αυτό αναδεύεται ήπια και μετά χύνεται προσεκτικά στο καλούπι. Για περίπου 30 λεπτά αφήνεται το μίγμα να πήξει και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.

Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης για πηκτώματα αгарόζης είναι οριζόντια δοχεία τα οποία φέρουν στα άκρα τους δύο ηλεκτρόδια από πλατίνα (Εικόνα 14). Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα μ' αυτό που παρασκευάστηκε το πήκτωμα και με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το πήκτωμα αξίζει να τονισθεί ότι πρέπει να τοποθετηθεί με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Ειδικότερα τα βοθρία υποδοχής των δειγμάτων τοποθετούνται προς την πλευρά του αρνητικού πόλου. Κατ' αυτόν τον τρόπο το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς τον θετικό πόλο.



**Εικόνα 14:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αгарόζης.

Τα νουκλεϊκά οξέα, μετακινούνται από τα αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια, λόγω του φυσικά -φερόμενο αρνητικού τους φορτίου που παρατηρείται στο σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας. Στα συγκεκριμένα πειράματα, η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα 1,5% αгарόζης, που μπορεί να διαχωρίσει τμήματα DNA μεγέθους 80bp – 4kb.

Ενδεικτικά για ένα μικρό πήκτωμα 1,5% αгарόζης, χρησιμοποιούνται οι ποσότητες του πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή του πηκτώματος.

<b>Παρασκευή πηκτώματος 1,5% αгарόζης</b>
60ml διάλυμα TAE (1x)
0,9 gr αгарόζη
Βρωμιούχο αιθίδιο (τελικής συγκέντρωσης 0.5μg/ml)

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση είναι το διάλυμα TAE, το οποίο περιέχει τα αντιδραστήρια του πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος TAE.

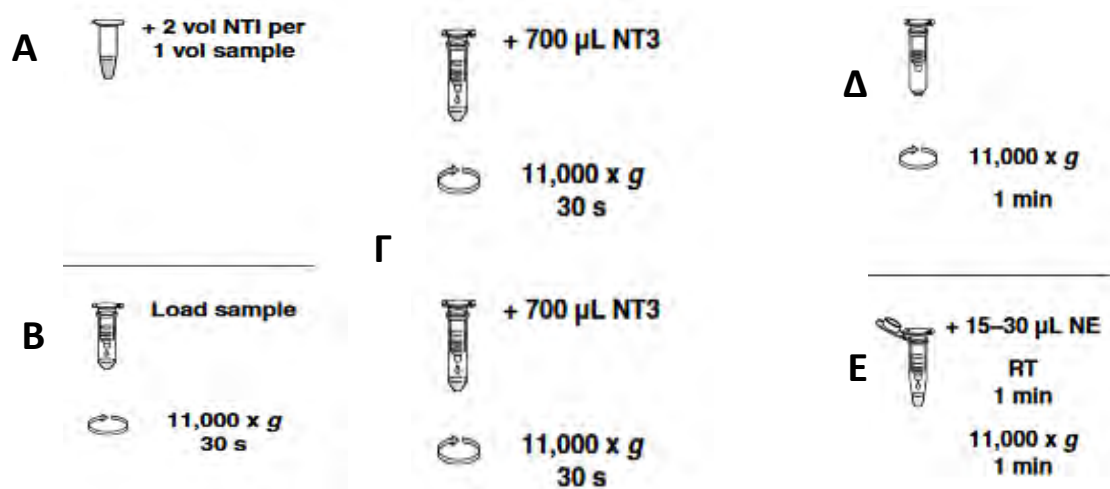
Διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Αρχική συγκέντρωση/lit
TAE	1 x 40 mM Tris- acetate 1 mM EDTA	50 x 242 g of Tris - base 57.1 ml of glacial acetic acid 100 ml of 0.5 M EDTA (pH = 8)

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Πριν φορτωθούν στο πήκτωμα τα δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης TAE(1x), το οποίο περιέχει 0.25% Bromophenol blue και 30% γλυκερόλη και νερό. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης χρωματίζει μπλε τα δείγματα για να είναι ευδιάκριτα καθώς κινούνται στο πήκτωμα, ενώ η γλυκερόλη παρέχει βάρος στα δείγματα για να καθιζάνουν στο πάτο των βοθρίων. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν στο πήκτωμα 5μl από τα 50μl αντίδρασης και 10μl από τα 20μl του αρνητικού μάρτυρα. Αφού ετοιμαστούν τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση φορτώνονται στα ειδικά βοθρία, συνδέονται κατόπιν τα ειδικά καλώδια στη συσκευή και ξεκινά η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Όταν ολοκληρωθεί, το πήκτωμα μεταφέρεται προσεκτικά σε μηχάνημα παρουσία UV για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

#### **3.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.**

Στο στάδιο αυτό, καθαρίζονται τα προϊόντα της PCR, τα οποία έδωσαν ειδικό προϊόν με το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey Nagel και σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Αρχικά μετράται η ποσότητα του κάθε δείγματος και κατόπιν προστίθεται νερό ώστε το δείγμα να έχει τελικό όγκο 50 μl. Ύστερα προστίθεται διπλάσιος όγκος από το διάλυμα NT1, (στην περίπτωση αυτή 100 μl), (Εικόνα 15 Α, Β). Ακολουθεί, μεταφορά του διαλύματος σε στήλες NucleoSpin Gel και PCR Clean-up σε ειδικά σωληνάκια χωρητικότητας των 2 ml και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 x g. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη αφαιρείται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωληνάκι. Έπειτα, προστίθενται 700 μl διάλυμα NT3 και φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 x g. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη αφαιρείται προσεκτικά και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται (Εικόνα 15 Γ). Στο σημείο αυτό, μεταφέρεται η στήλη σε νέο σωληνάκι των 2 ml και γίνεται ξανά μία φυγοκέντρωση χωρίς να προστεθεί τίποτα στη στήλη για 1 λεπτό στα 11.000 x g, με σκοπό να αφαιρεθεί ολοκληρωτικά το διάλυμα NT3 (Εικόνα 15 Δ). Τέλος η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι με καπάκι, προστίθεται διάλυμα έκλουσης NE (15 – 30

μl) και γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g (Εικόνα 15 Ε). Η ποσότητα του διαλύματος έκλουσης που προστίθεται στα δείγματα εξαρτάται από την ένταση του ειδικού σήματος στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



**Εικόνα 15:** Η συνοπτική απεικόνιση των σταδίων για το καθαρισμό των προϊόντων της PCR.

Αφού ολοκληρωθεί ο καθαρισμός των προϊόντων PCR ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα 1% αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ο μάρτυρας 2-log ladder (N.E. Biolabs) βάσει του οποίου εκτιμάται το μέγεθος και η ποσότητα των δειγμάτων. Για την ανάλυση των καθαρισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 1μl από το κάθε δείγμα.

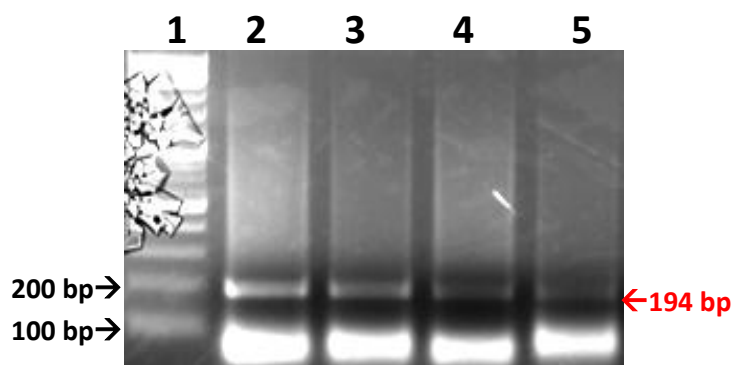
### **3.2.5 Αλληλούχηση των προϊόντων της PCR**

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR εκτελέστηκε από μία εξειδικευμένη εταιρεία βιοτεχνολογικών και μοριακών τεχνικών με την επωνυμία **CEMIA** (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Για την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν τόσο ο Forward όσο και ο Reverse εκκινητής του Πίνακα 2, με την πλειοψηφία των δειγμάτων να αλληλουχείται με τον Reverse εκκινητή, καθώς βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από τις θέσεις των μεταλλάξεων. Τα αποτελέσματα των αλληλουχήσεων στάλθηκαν υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία αναλύθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος **BioEdit v7.2.5** (developer Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA 92008, Last update 12/11/2013, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

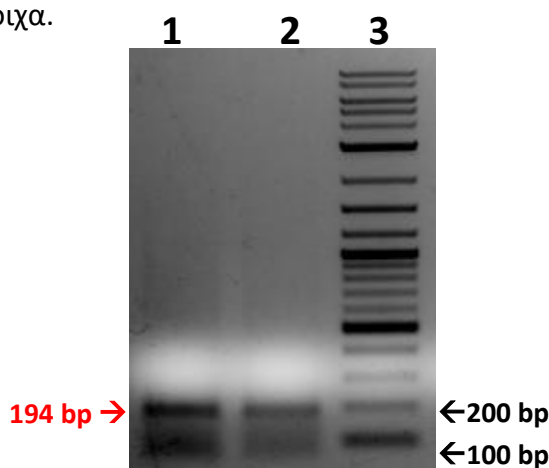
#### 4. Αποτελέσματα- Συζήτηση

##### 4.1 Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου TERT με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Στα πειράματα με το ένζυμο Kara Taq DNA πολυμεράση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο DMSO, διότι η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει είναι πλούσια σε βάσεις GC, με αποτέλεσμα το DMSO να βοηθάει στην αποδιάταξη του DNA. Αντίστοιχα στα πειράματα με το ένζυμο Hot Star DNA polymerase το kit περιείχε το Q-solution, το οποίο έχει αντίστοιχη δράση με το DMSO. Αρχικά παρασκευάστηκαν 4 δείγματα που περιείχαν τα ίδια αντιδραστήρια αλλά διαφορετική συγκέντρωση DMSO (3%, 5%, 7.5% και 10%). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 16), με βάση την οποία επιλέχθηκε η παρουσία του DMSO σε τελική συγκέντρωση 5% καθώς οδηγεί στην παραγωγή ειδικού προϊόντος με μεγαλύτερης ποσότητας.



**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% της περιοχής ενίσχυσης του γονιδίου TERT με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 2-5:** Ενίσχυση γενωμικού DNA παρουσία 5, 7.5, 10 και 3% DMSO αντίστοιχα.

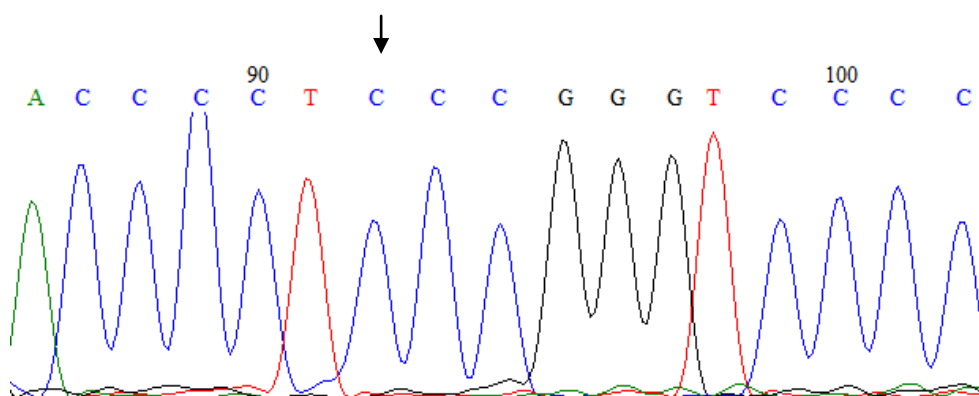


**Εικόνα 17:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου TERT με αντίδραση PCR μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομές 1-2:** Καθαρισμένα προϊόντα PCR των δειγμάτων 48, και 51. **Διαδρομή 3:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp).

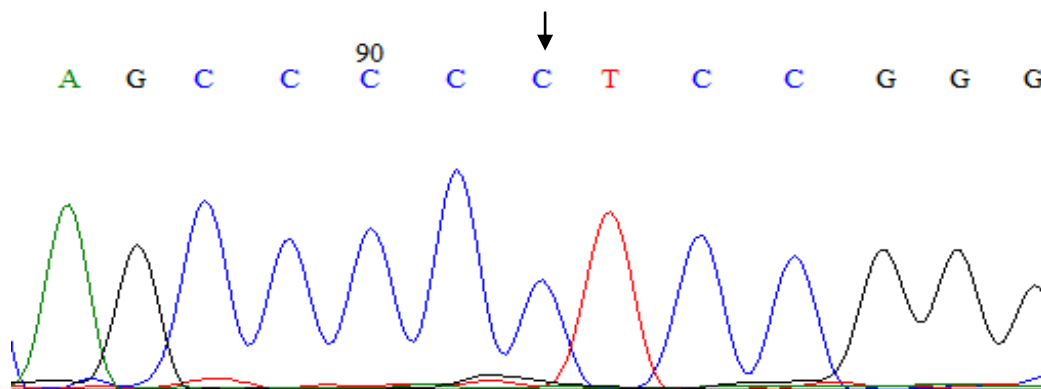


## 4.2 Αλληλούχηση δειγμάτων

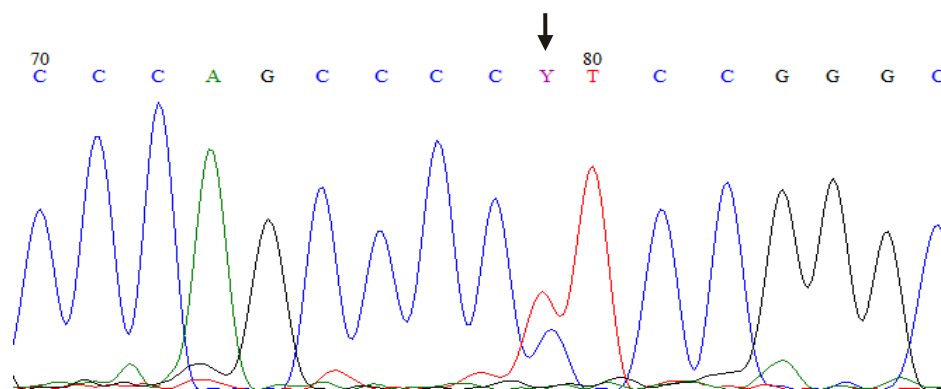
Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές του γονιδίου TERT, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στις Εικόνες 18 έως 21 δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογράφημα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Οι εικόνες εστιάζονται στην περιοχή που απαντώνται οι μεταλλάξεις που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία και αφορούν τις περιοχές C250T, C243T C242T και C228T.



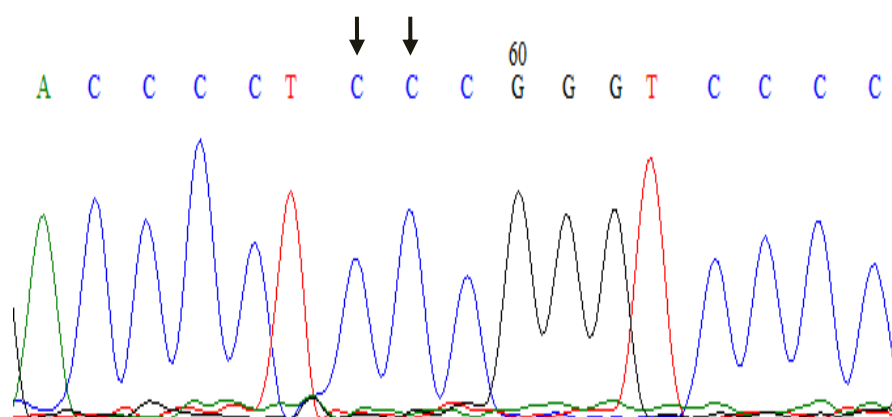
**Εικόνα 18 :** Χρωματογράφημα της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TERT. Με το μαύρο βέλος σημειώνεται η βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στη θέση -146 bp (C250T) . Η παρουσία C υποδηλώνει την απουσία μετάλλαξης.



**Εικόνα 19 :** Χρωματογράφημα της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TERT. Με το μαύρο βέλος σημειώνεται η βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στη θέση -124 bp (C228T). Η παρουσία C υποδηλώνει την απουσία μετάλλαξης.



**Εικόνα 20 :** Χρωματογράφημα της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TERT για το δείγμα 45. Με το μαύρο βέλος σημειώνεται η βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στη θέση -124 bp. Η ταυτόχρονη παρουσία C και T υποδηλώνει την παρουσία μετάλλαξης C228T στο συγκεκριμένο δείγμα.



**Εικόνα 21 :** Χρωματογράφημα της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TERT. Με το μαύρο βέλος σημειώνεται η βάση που συναντάται στην περιοχή του υποκινητή στις θέσεις -139 και -138 bp. Η παρουσία C υποδηλώνει την απουσία μετάλλαξης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις του υποκινητή του γονιδίου TERT στις θέσεις C250T, C243T και C242T σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα. Όσον αφορά την μετάλλαξη στη θέση C228T ταυτοποιήθηκε ένα δείγμα, που φέρει την αλλαγή C>T, σε ένα θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους υποτύπου μιας ασθενούς. Συγκεκριμένα, η ασθενής που είχε την μετάλλαξη ήταν ηλικίας 67 ετών, το οποίο είναι σύμφωνο με πολλές μελέτες οι οποίες συσχέτισαν τις μεταλλάξεις αυτές με προχωρημένη ηλικία (Liu et al. 2014a). Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη που βρέθηκε στην ασθενή ήταν η C228T, η οποία όπως είναι γνωστό είναι η πιο κοινή μετάλλαξη στον υποκινητή της τελομεράσης (Xing et al., 2014). Το ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων TERT στην παρούσα εργασία είναι ~7%, το οποίο είναι σύμφωνο με πρόσφατες μελέτες που εκτιμούν ότι το ποσοστό εμφάνισης των μεταλλάξεων TERT στα FVPTC είναι 8% (Lee et al., 2015). Ωστόσο η συγκεκριμένη γενετική αλλαγή δεν βρέθηκε τόσο σε συμβατικά θηλώδη καρκινώματα όσο και σε θυλακιδώδη καρκινώματα, παρόλο που έχουν δείχθει ότι έχουν αυτές τις μεταλλάξεις με ποσοστά ~10% και ~15% αντίστοιχα (Liu et al., 2016). Σημαντικό εύρημα στην

παρούσα μελέτη ήταν το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη ασθενή ταυτοποιήθηκε εκτός από την μετάλλαξη C228T και η μετάλλαξη BRAFV600E. Καταληκτικά, παρόλο που η εργασία αυτή είναι μοναδική στον ελληνικό πληθυσμό, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

## **5. Βιβλιογραφία**

1. Gray and Carter, Gray's anatomy 41<sup>st</sup> edition, XI splachnology, The Ductless Glands, a. The thyroid gland, b. The parathyroid glands, 2016.
2. Keith L. Moore, T.V.N Persaud, Η ανθρώπινη διάπλαση: Εμβρυολογία κλινικού προσανατολισμού, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2009, σελ. 197-199,.
3. Moore, Persaud, Shiota, Έγχρωμη κλινική εμβρυολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, σελ.134-135.
4. Guyton and Hall, Ιατρική Φυσιολογία, 12<sup>η</sup> έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού, Κεφάλαιο 74 και 76.
5. Xing, M., Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer, Nat Rev Cancer, 2013, 13(3): p. 184-99.
6. Fletcher, Diagnostic histopathology of tumors, 4<sup>th</sup> edition, 2013.
7. DeLellis, Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Vol. 8. 2004.
8. Pacini, F., et al., Medullary thyroid carcinoma. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2010, ;22(6): p. 475-85,.
9. Chung KW, Yang SK, Lee GK, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. Clin Endocrinol (Oxf), 2006, ;65(5):660–666,.
10. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. Thyroid. 2009, ;19(12):1351–1361.
11. Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins, BRAF mutations in papillary thyroid cancer, Cell Cycle, 2007, ;6(3):377–379.
12. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma, Cancer Res. 2003, ;63(7):1454–1457.
13. Chiosea S, Nikiforova M, Zuo H, et al. A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma, Endocr Pathol, 2009, ;20(2):122–126.
14. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid, Diagn Mol Pathol. 2006 ;15(3):136–143.
15. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. Surgery. 1994;116(6):1010–1016.
16. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer, Ian A. Prior, Paul D. Lewis and Carla Mattos Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457–2467.
17. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/ NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features, Clin Cancer Res. 1998 ;4(1): 223–228.

18. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma, 2006 Jan; 91(1):213-20.
19. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(8):1016–1023.
20. Maria Pia Longhese, DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres, *Genes Dev.*, 2008.
21. de Lange, T., Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 2005, 19(18): p. 2100-2110.
22. Liu, Y., et al., The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo, *Current Biology*, 2000. 10(22): p. 1459-1462.
23. Blackburn, E.H. and J.G. Gall, A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, 1978. 120 (1): p. 33-53
24. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB, Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo, 1995 Sep;220(1):194-200.
25. Blackburn, E.H. and J.G. Gall, A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*, *J. Mol Biol*, 1978, 120(1): p. 33-53
26. Bodnar, A.G., et al., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, *Science*, 1998. 279(5349): p. 349-52.
27. Kim, N.W., et al., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science*, 1994, 266(5193): p. 2011-5.
28. Cong, Y.S., J. Wen, and S. Bacchetti, The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(1): p. 137-42.
29. Scott, G.A., T.S. Laughlin, and P.G. Rothberg, Mutations of the TERT promoter are common in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*, 2014. 27(4): p. 516-23
30. Huang, F.W., et al., Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma, *Science*, 2013. 339(6122): p. 957-9.
31. Horn, S., et al., TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, 2013, 339(6122): p. 959-61.
32. Lee YS, Kim Y, Jeon S, Bae JS, Jung SL & Jung CK 2015 Cytologic, clinicopathologic, and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: 10 case reports and systematic literature review. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 7988–7997.
33. Rengyun Liu and Mingzhao Xing, TERT promoter mutations in thyroid cancer, *Endocr Relat Cancer*. 2016 Mar; 23(3): R143–R155.
34. Saji M & Ringel MD 2010 The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 321 20–28.

35. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L et al. 2013 Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature Communications* 4 2185.
36. Tiantian Liu,<sup>1,\*</sup> Xiaotian Yuan,<sup>2</sup> and Dawei Xu<sup>2,3</sup> Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications, *Genes* (Basel), 2016 Jul; 7(7): 38.
37. Mingzhao Xing, Rengyun Liu, Xiaoli Liu, Avaniyapuram Kannan Murugan, Guangwu Zhu, Martha A.
38. Zeiger, Sara Pai, and Justin Bishop, BRAF V600E and TERT Promoter Mutations Cooperatively Identify the Most Aggressive Papillary Thyroid Cancer With Highest Recurrence See accompanying editorial, *Journal of clinical oncology*, September 2014, volume 32, number 25.
39. Peter J. Russel *iGenetics*, A mendelian approach p 709-713.
40. Kowalska A, Sygut J., The clinical course of poorly differentiated thyroid carcinoma (insular carcinoma) - own observations, *Endokrynol Pol.* 2010, Sep-Oct;61(5):467-73.
41. Liu T., Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J, Larsson C & Xu D The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas, 2014a, *Oncogene* 33 4978–4984.
42. Liu R., Xing M., TERT promoter mutations in thyroid cancer, *Endocr Relat Cancer*, 2016 Mar; 23(3): R143–R155.